

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Daška Štulhofer Buzina

**Određivanje vrijednosti antigena
buloznoga pemfigoida 1 i 2 za procjenu
aktivnosti bolesti**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

Rad je izrađen u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof.dr.sc. Branka Marinović

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli pri izradi ovoga rada:

Posebnu zahvalnost izražavam mojoj mentorici, prof.dr.sc. Branki Marinović koja mi je stručnim savjetima puno pomogla u izradi ovog rada.

Najljepše se zahvaljujem laboratorijskoj tehničarki Martini Jurin i cijelom timu Kabineta za kliničku imunologiju, imunofluorescentnu i serološku dijagnostiku bolesti kože.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Aleksandri Basta-Juzbašić na pomoći i podršci u izradi disertacije, medicinskoj sestri Agnezi Gembec te mojim suradnicima u Ambulanti za dermatokirurgiju i djelatnicima Kabineta za dermatohistopatologiju.

Veliko hvala prof.dr.sc. Aleksandru Štulhoferu, mojem bratu, na pomoći u statističkoj analizi rezultata i podršci za vrijeme izrade disertacije.

Konačno velika hvala mojoj majci i suprugu Zlatku na poticanju i razumijevanju.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

POPIS SLIKA

POPIS TABLICA

1. UVOD.....	1
1.1. Bulozni pemfigoid.....	2
1.1.1. Povijesni pregled.....	2
1.1.2. Epidemiologija.....	3
1.1.3. Etiopatogeneza.....	5
1.1.4. Provocirajući čimbenici i pridružene bolesti.....	7
1.1.5. Klinička slika.....	9
1.1.6. Dijagnostika.....	13
1.1.7. Diferencijalna dijagnoza.....	17
1.1.8. Liječenje.....	19
1.1.9. Prognoza i mortalitet.....	24
1.2. Građa bazalne membrane kože.....	26
1.2.1. Hemidezmosomi.....	26
1.2.1.1. Antigen buloznog pemfigoida 1.....	27
1.2.1.2. Antigen buloznog pemfigoida 2.....	27
1.2.1.3. Integrini.....	28
1.2.1.4. Plektin.....	29
1.2.2. Lamina lucida.....	29
1.2.3. Lamina densa.....	29
1.2.3.1. Kolagen tipa IV.....	30
1.2.3.2. Laminini.....	30
1.2.3.3. Nidogen.....	31
1.2.3.4. Heparan sulfat proteoglikani.....	32
1.2.4. Sublamina densa.....	32
1.2.4.1. Kolagen tipa VII.....	32
1.3. Postojeće spoznaje o primjeni ELISA BP 1 i ELISA BP 2 u bolesnika s BP.....	34
1.3.1. Dijagnostička vrijednost BP 1 i 2.....	34
1.3.2. Aktivnost bolesti i vrijednosti ELISA BP 1 i 2.....	35

1.3.3. Vrijednosti ELISA BP 1 i 2 i IIF.....	36
2. HIPOTEZA	40
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	42
4. MATERIJALI I METODE	44
4.1. Materijali.....	45
4.2. Metode	47
4.2.1. Protokol za unos podataka	47
4.2.2. Histološka analiza	47
4.2.3. Direktna imunofluorescencija.....	47
4.2.4. Indirektna imunofluorescencija.....	47
4.2.5. ELISA BP 1 i BP 2 metoda	48
4.2.6. Desmoglein 1 i 3 ELISA test	48
4.2.7. Statistička analiza	49
5. REZULTATI.....	50
5.1. Uzorak.....	51
5.1.1. Izraženost kliničke slike u bolesnika s BP tijekom godine dana ...	52
5.1.2. Vrijednosti IIF, ELISA BP 1 i ELISA BP 2 u inicijalnom mjerenju .	53
5.1.3. Osjetljivost seroloških metoda u fazi aktivne bolesti	54
5.2. Povezanost vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 s različitim fazama bolesti	55
5.3. Povezanost vrijednosti IIF s različitim fazama bolesti	56
5.4. Usporedba veličine povezanosti između vrijednosti ELISA BP 1 i IIF te različitih faza bolesti.....	57
5.5. Usporedba praćenja aktivnosti bolesti testovima ELISA BP 1 i BP 2..	58
5.6. Utjecaj spola na vrijednosti ELISA BP 1 i ELISA BP 2	60
5.7. Utjecaj dobi na vrijednosti ELISA BP 1 i ELISA BP 2.....	62
5.8. Prisutnost pratećih bolesti u bolesnika u remisiji nakon 12 mjeseci	65
6. RASPRAVA.....	66
7. ZAKLJUČCI.....	77
8. SAŽETAK	79
9. SUMMARY	81
10. LITERATURA.....	83
11. BIOGRAFIJA.....	99
PROTOKOL ZA UNOS PODATAKA	

POPIS KRATICA

BM	bazalna membrana
BP	bulozni pemfigoid
BPAg1	<i>bullous pemphigoid antigen 1</i> = antigen buloznog pemfigoida 1
BPAg2	<i>bullous pemphigoid antigen 2</i> = antigen buloznog pemfigoida 2
C	<i>complement</i> = komplement
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> = stanični diferencijacijski antigeni
COL7A1	gen za kolagen tipa 7
DIF	direktna imunofluorescencija
DST	<i>dystonin</i> = distonin
EBA	<i>epidermolysis bullosa aquisita</i> = stečena bulozna epidermoliza
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> = enzim-vezani imunosorbentni test
HD	hemidezmosomi
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> = humani leukocitni antigen
HSPG	heparan sulfat proteoglikan
IgA	imunoglobulin A
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IIF	indirektna imunofluorescencija
IL	interleukin
INF	interferon
KS	kortikosteroidi
MMF	mikofenolat mofetil
NC1	<i>non-collagen C1 domain</i> = nekolagena C1 domena
NC2	<i>non-collagen C2 domain</i> = nekolagena C2 domena

NC16A	<i>non-collagen 16A domain</i> = nekolagenska 16A domena
PAS	para-aminosalicilna kiselina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> = reaktivni metabolit kisika
Th	<i>T helper lymphocytes</i> = pomoćnički T limfocit
TPMT	tiopurin metiltransferaza
UV	<i>ultraviolet</i> = ultraljubičasto

POPIS SLIKA

Slika 1. Klinički izgled bolesnika s buloznim pemfigoidom – prebulozni stadij.	10
Slika 2. Klinički izgled bolesnika s buloznim pemfigoidom – bulozni stadij... ..	11
Slika 3. Patohistološka slika buloznog pemfigoida (HE x40).	14
Slika 4. Direktna imunofluorescencija bolesnika s buloznim pemfigoidom....	15
Slika 5. Indirektna imunofluorescencija bolesnika s buloznim pemfigoidom.	16
Slika 6. Prateće bolesti u uzorku.	51
Slika 7. Prateće bolesti u uzorku bolesnika u remisiji i u aktivnoj fazi bolesti nakon 12 mjeseci.....	65

POPIS TABLICA

Tablica 1.	Raspodjela kliničkog nalaza kod bolesnika s BP prema mjerenjima.....	52
Tablica 2.	Pozitivne i negativne vrijednosti IIF, BP 1 i BP 2 u inicijalnom mjeranju.	53
Tablica 3.	Osjetljivost testova IIF, ELISA BP 1 i ELISA BP 2 u fazi aktivne bolesti u inicijalnoj točki mjerenja.	54
Tablica 4.	Povezanost između vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 i različitih faza bolesti nakon 6 i 12 mjeseci.....	55
Tablica 5.	Povezanost između vrijednosti IIF i različitih faza bolesti nakon 6 i 12 mjeseci.....	56
Tablica 6.	Veličina povezanosti vrijednosti BP 1 i IIF s različitim fazama bolesti.....	57
Tablica 7.	Prosječne vrijednosti testova ELISA BP 1 i BP 2 u inicijalnoj i posljednjoj točki mjerenja u dva specifična poduzorka bolesnika.....	58
Tablica 8.	Spolne razlike u vrijednostima ELISA BP 1 i ELISA BP 2.	60
Tablica 9.	Dobne razlike u vrijednostima ELISA BP 1 i ELISA BP 2.....	63

Autoimune bulozne dermatoze čini heterogena skupina dobro definiranih, teških bolesti karakteriziranih bulama i erozijama na koži i sluznicama koje nastaju kao posljedica gubitka veza unutar epidermisa ili između epidermisa i dermisa (1). Dijele se na četiri glavne grupe: skupina pemfigusa, skupina pemfigoida, stečena bulozna epidermoliza i herpetiformni dermatitis (2,3). Bolesti iz skupine pemfigoida obilježene su subepidermalnim mjehurima koji nastaju kao posljedica djelovanja protutijela usmjerenih prema različitim strukturnim komponentama bazalne membrane. U skupinu bulozog pemfigoida ubrajaju se: bulozni pemfigoid, gestacijski pemfigoid, linearna IgA dermatozna te pemfigoid sluznica (2,3).

1.1. Bulozni pemfigoid

Bulozni pemfigoid (BP) pripada skupini organ-specifičnih autoimunih buloznih dermatozna, skupini pemfigoida (1). Sam naziv BP je pleonazam jer je nastao kombinacijom latinske riječi *bulla* koja znači mjehur i grčkih riječi za „oblik mjehura“ (πέμφιξ – zrak, mjehur i εἶδος – oblik) (4). BP je obilježen subepidermalnim mjehurom i autoprotutijelima usmjerenim protiv hemidezmosomskih struktura (5).

1.1.1. Povijesni pregled

Tek je 1953. godine Walter Lever, na temelju kliničke i histološke slike, unutar skupine buloznih dermatozna, razlučio bulozni pemfigoid od vulgarnog pemfigusa. U početku su pod pojmom pemfigusa svrstavane bolesti koje uopće nisu bile bulozne, kasnije su pak ubrajane sve koje su u kliničkoj slici imale mjehure, bule ili pustule. Tako je još Hipokrat (460. – 370. godine prije N.E.) u svojim radovima spominjao „pemfigodes piretoi“ kao naziv za vrućice s fatalnim ishodom. Galen (131. – 210. godine) je također preuzeo termin „*febris pemphigodes*“ za bolesti praćene razvojem vezikula i bula po sluznicama uz povišenu tjelesnu temperaturu (6). Čini se da je prvi opis BP dao Sigismund Koenig Bernski 1681. godine, opisujući u *Journale de Medicine* neobičan prikaz pacijentice koja je razvila mjehure ispunjene bistrim sadržajem po koži,

a koji su opetovano nastajali tijekom 8 mjeseci. Nakon remisije koja je trajala devet mjeseci bolest se ponovno pojavila i moguće je da je to bio prvi opis klasične stečene bulozne dermatoze (7).

Ubrzo je naziv pemfigus postao sinonim za bolest koja se prezentira mjehurom (6). Postupno su se nizala otkrića koja su pridonijela razumijevanju buloznih dermatozata. Tako je 1881. godine Heinrich Auspiz nazvao akantolitičkima, stanice koje su izgubile međusobne veze, kod bolesnika s pemfigusom (8). Arnauld Tzanck 1948. godine objavio je rad o novoj citološkoj metodi za razlikovanje pemfigusa od drugih buloznih dermatozata, tzv. „Tzanck-ov test“ (9). Bili su to kamenčići koje je Lever polako slagao u mozaik. U svom najvažnijem radu „Pemfigus“, objavljenom 1953. godine u časopisu *Medicine*, napisao je da je vulgarni pemfigus po život opasna dermatozata, koja uglavnom rezultira fatalnim ishodom za bolesnika, a obilježena je intraepidermalnim mjehurima i akantolizom, dok je BP bolest s mnogo boljom prognozom, obilježena subepidermalnim mjehurima. Bio je to ključni trenutak za razlikovanje ove dvije skupine buloznih dermatozata (2,6,10).

Jordon i suradnici su 1967. godine identificirali serumska autoprotutijela usmjerena protiv proteina bazalne membrane u bolesnika s BP (11). Korak dalje došli su Mutasim i suradnici te su utvrdili da su ta autoprotutijela usmjerena prema hemidezmosomima (12).

1.1.2. Epidemiologija

BP najčešća je autoimuna bulozna dermatozata u Europi i Sjevernoj Americi. U epidemiološkoj studiji u sjeverozapadnoj Bavarskoj utvrđena je incidencija od 6,6 novo dijagnosticiranih bolesnika na milijun stanovnika godišnje, dok je u tri regije u Francuskoj evidentirano 7 novo dijagnosticiranih bolesnika na milijun stanovnika godišnje (13,14). Neke druge studije pokazuju veću incidenciju, kao što je to u Bristolu u Velikoj Britaniji, gdje se incidencija procjenjuje na 10 novo otkrivenih na milijun stanovnika, a u ženevskoj studiji čak 30 na milijun stanovnika godišnje (15). Visoka incidencija od 42,8/1000000 stanovnika godišnje utvrđena je u studiji provedenoj u Velikoj Britaniji (16). Ta visoka

incidencija, čini se, posljedica je metodoloških problema istraživanja, budući da su podaci prikupljeni iz registra liječnika opće medicine, bez imunopatoloških kriterija, specifikacije tipa pemfigoida, pa su i neke bolesti koje se prezentiraju bulama (npr. bulozna medikamentozna reakcija i druge) također neopravdano uključene (17,18).

BP se najčešće pojavljuje u sedmom i osmom desetljeću života, dok je u dječjoj dobi izuzetno rijedak (5). Incidencija se povećava sa starenjem, pa u osoba iznad 80 godina iznosi 150-180/1000000 stanovnika godišnje (4). Rizik za razvoj bolesti u osoba starijih od 90 godina je 300 puta veći nego u onih od 60 godina i mlađih (17). Novija, velika prospektivna studija incidencije BP provedena na švicarskoj populaciji pokazala je incidenciju od 12,1 novih slučajeva na milijun stanovnika godišnje (18). Na temelju njemačke studije, provedene u dvjema regijama Mannheimu i donjoj Frankoniji na 1,7 milijuna stanovnika, dobiveni su slični rezultati od 13,4 novo oboljelih na milijun stanovnika na godinu (14). Za razliku od većine drugih autoimunih bolesti muškarci obolijevaju, u starijim dobnim skupinama, češće od žena (17). S obzirom na starenje populacije i na pojedine oblike BP koje je ponekad teško dijagnosticirati, čini se da se broj bolesnika s BP u Europi stalno povećava, što bi moglo biti sve značajniji javno-zdravstveni problem (16,17). Naime, prema podacima iz donje Frankonije u Republici Njemačkoj i studije provedene u Velikoj Britaniji, incidencija BP se u 10 godina povećala 2, odnosno 4,8 puta (13,16,19).

BP se također može pojaviti i u djece. Pojava BP u djece smatra se rijetkom. Izraelsko istraživanje Waisbourd-Zinman i suradnika procijenilo je incidenciju od 2,36 novih slučajeva na jedan milijun u dječjoj dobi godišnje (20). Opaženo je da su pojedini HLA haplotipovi učestaliji kod bolesnika s BP te da su različiti u različitim rasa. U bijelaca s BP povećana je pojavnost HLA-DQB1*0301 alela, a među japanskim bolesnicima HLA-DRB1*04, DRB1*1101 i DQB1*0302 (21,22,28). Među bolesnicima u sjevernoj Kini primijećena je manja pojavnost HLA-DRB1*08 i HLA-DQB1*06 u bolesnika s BP u odnosu na kontrolnu skupinu (21,22).

1.1.3. Etiopatogeneza

Bulozni pemfigoid je bolest nepoznatog uzroka. Obilježena je autoprotutijelima usmjerenim prema dvjema komponentama hemidezmosoma: transmembranskom antigenu buloznog pemfigoida 2 (BPAg2, BP180, kolagen XVII) i intracelularnom antigenu buloznog pemfigoida 1 (BPAg1, BP230), uglavnom IgG1, IgG4 i IgE klase (2,3,12). Prema istraživanjima dobivenim na životinjskim modelima, čini se da autoprotutijela usmjerena prema BPAg2 uzrokuju početni nastanak mjehura i vjerojatno oštećenje bazalnih stanica, a autoprotutijela usmjerena prema BPAg1 mogu pojačati upalnu reakciju (23,24).

Nekolageni dio BPAg2, NC16A, sadrži glavne antigene lokuse (NC16A2, NC16A2.5, NC16A3) koje prepoznaju protutijela gotovo svih bolesnika s BP. Serum bolesnika s BP sadrži autoprotutijela koja reagiraju s brojnim drugim epitopima smještenim na intracelularnoj i ekstracelularnoj domeni BPAg2. Iako su autoprotutijela usmjerena prema NC16A domeni patognomonična i dovode do razvoja bolesti, kod nekih je bolesnika ustanovljeno kako njihova autoprotutijela reagiraju s epitopima na ekstracelularnoj, ne-NC16A domeni, i tako razvijaju bolest (24). Autoprotutijela (IgG) usmjerena prema karboksi-terminalnoj domeni BPAg2 rezultiraju težom kliničkom slikom i obično zahvaćaju sluznicu (25).

U serumu bolesnika s BP nalaze se i autoprotutijela usmjerena prema BPAg1. Oko 60% seruma bolesnika s BP imaju IgG autoprotutijela usmjerena na karboksi-terminalnu domenu BPAg1 (26). Utvrđena su autoprotutijela koja se vežu na amino-terminalnu domenu i centralnu domenu BPAg1 (27). U serumu bolesnika često se nađu imunoglobulin E (IgE) i imunoglobulin A (IgA) autoprotutijela usmjerena na BPAg1 i BPAg2 (28). Prisutnost većeg broja antigenih epitopa duž BPAg2 i BPAg1, također po drugim komponentama bazalne membrane, s kojima reagiraju autoprotutijela bolesnika s BP, naziva se fenomenom „širenja epitopa“ (29).

Također, utvrđeni su autoreaktivni T limfociti u povećanom broju kod osoba HLA-DQβ*0301 haplotipa u bijelaca. Stoga je sve više dokaza da određeni aleli HLA klase II igraju važnu ulogu u patogenezi BP (5). Naime, bolesnici s

BP razvijaju autoreaktivne T limfocite usmjerene na BPAg2 i BPAg1, što je najvjerojatnije presudan trenutak za stimulaciju B limfocita na stvaranje autoprotutijela (30). Autoreaktivni T limfociti reagiraju s istim domenama BPAg2 i BPAg1 kao i imunoglobulin G (IgG) autoprotutijela. CD4 T limfociti bolesnika s BP stvaraju Th1 i Th2 citokine. Th1 citokini, npr. interferon γ (INF- γ), potiču stvaranje IgG1 i IgG2, a Th2 citokini, kao interleukin (IL)-4, IL-5 i IL-13 sudjeluju u stvaranju IgG4 i IgE. Čini se da upravo Th2 citokini imaju posebno istaknuto mjesto u patogenezi BP, budući su zastupljeni u najvećem broju u kožnim lezijama i serumu bolesnika s BP (31). Usporedbom količine citokina u serumu bolesnika s BP utvrđeno je da njihova povišena ekspresija u velikom broju korelira s brojem kožnih lezija (28).

Nakon početnog vezanja autoprotutijela, vjerojatno dolazi do aktivacije komplementa i oslobađanja IL-6 i IL-8 iz bazalnih keratinocita što rezultira kemotaksijom upalnih stanica (neutrofila i eozinofila) u područje epidermodermalne granice i papilarnog dermisa. Upalne stanice dovode do oslobađanja proteinaza (matriks metaloproteinaze 9, plazmina, inhibitora α 1 proteinaze, neutrofilne elastaza, proteinaze mastocita 4) i reaktivnih metabolita kisika (Reactive Oxygen Species - ROS) što rezultira razgradnjom hemodezmosoma i razdvajanjem na razini lamina lucida (28,30).

U ranoj urtikarijalnoj fazi BP čini se da važnu ulogu ima IgE usmjeren prema BPAg2. IgE autoprotutijela pridonose razvoju kožnih lezija stimulacijom degranulacije mastocita i bazofila (31,32). Iwata i suradnici utvrdili su prisutnost IgE autoprotutijela usmjerenih prema BPAg2 kod bolesnika s teškim oblicima BP, kod kojih je liječenje zahtijevalo puno agresivnije tretmane, veće doze imunosupresiva i duži vremenski period za postizanje remisije (33). U bolesnika s BP utvrđena su i autoprotutijela usmjerena prema α 6 integrinu i lamininu 332, još dvjema komponentama bazalne membrane, koja također dovode do razvoja kliničke slike BP (5).

1.1.4. Provocirajući čimbenici i pridružene bolesti

Povezanost maligne bolesti i razvoja BP niz je godina predmet rasprave među stručnjacima. U prvom redu spominjala se povezanost s tumorima probavnog i mokraćnog sustava (karcinom bubrega, žučnog mjehura, debelog crijeva, dojke, pluća, parotide) i limfoproliferativnim bolestima (34).

Dvije velike kontrolirane populacijske studije provedene u SAD-u i Švedskoj nisu utvrdile statistički značajno veći broj malignih oboljenja u bolesnika s BP u odnosu na osobe iste dobi i spola bez BP, iako nije isključena povezanost u pojedinih bolesnika (35,36). Potencijalno prisustvo maligne bolesti u bolesnika s BP vjerojatno je vezano uz visoku dob i detaljnu dijagnostiku koja se provodi u bolnicama. Bolesnici koji obole od BP prije šezdesete godine imaju veći rizik za razvoj maligne bolesti (37). Nasuprot tome u ispitivanju Ogawe i suradnika u japanskoj je populaciji utvrđena veća učestalost malignih bolesti u bolesnika s BP u odnosu na kontrolnu skupinu (38). Naime, u istraživanju na 1113 Japanaca s BP u 64 (5,8%) bolesnika utvrđena je povezanost maligne bolesti (karcinom želuca) i BP. Ta povezanosti bila je posebno izražena u dobnoj skupini iznad 70 godina starosti u odnosu na kontrolnu skupinu iste dobi (38). Stoga je kod bolesnika s BP, ovisno o njihovoj dobi i anamnestičkim podacima, smisljeno učiniti obradu kako bi se isključila maligna bolest (28).

Veća učestalost pojave BP u bolesnika s drugim autoimunim bolestima kao što su reumatoidni artritis, Hashimotov tiroiditis, dermatomiozitis, lupus erythematosus, vitiligo ili autoimuna trombocitopenija, također nije dokazana u kontroliranim studijama, no odražava urođenu genetsku sklonost razvoju autoimunih bolesti (39,40). Opisana je i istodobna pojavnost BP, psorijaze i lihen ruber planusa što se tumači fenomenom širenja epitopa („*epitope spreading*“). Čini se da upalni procesi unutar bazalne membrane dovode do izlaganja epitopa djelovanju autoreaktivnih T limfocita što rezultira sekundarnim imunološkim odgovorom i mogućim razvojem BP u predisponiranih osoba (31,41). Dio autora smatra da je istodobna učestala pojavnost psorijaze i BP jednim dijelom posljedica imunoloških zbivanja u području bazalne membrane, a drugim dijelom uzrokovana iritativnim djelovanjem terapije koja se primjenjuje kod bolesnika sa psorijazom. Naime,

uz već opisane moguće imunološke mehanizme, čini se da i oštećenje bazalne membrane, kao posljedica terapijske traumatizacije, dovodi do izlaganja epitopa cirkulirajućim protutijelima (28,42).

Kod većine opisanih slučajeva BP se pojavio nakon primijenjene terapije poput katrana, antralina, psoralena, helioterapije, kombinirane terapije psoralena s UVA zračenjem (PUVA) ili terapije UVB ili UVA zrakama. Kod dijela bolesnika sa psorijazom nije nađen nikakav uzročni faktor, a BP se pojavio prije primjene ikakve terapije (43). Kontrolirane studije su potvrdile neovisnu povezanost između psorijaze i BP (25,44,45). Važno je napomenuti da dio bolesnika sa psorijazom tijekom PUVA terapije može razviti buloznu reakciju, no ne i buloznu dermatozu. Riječ je o fototoksičnoj reakciji ili slučajnoj primjeni prevelike doze fotosenzibilizatora i/ili UVA zračenja. Bulozne lezije se pojavljuju na eritematoznoj koži, a histološki su karakterizirane velikim brojem tzv. „sunburn“ stanica (41,46). Uočena je istodobna pojavnost BP i psorijaze s drugim bolestima, primjerice sklerodermijom, Hashimotovim tiroiditisom i vitiligom (40).

Kod bolesnika s BP uočena je i pojava drugih bolesti, prvenstveno šećerne bolesti, perniciozne anemije, ulceroznog kolitisa, hipertireoze, hipotireoze, alopecije i drugih buloznih dermatozu kao što su vulgarni pemfigus, pemphigus foliaceus, linearna IgA dermatozu i dermatitis herpetiformis (47,48). Prisutnost šećerne bolesti, prije započinjanja kortikosteroidne terapije, u bolesnika s BP je značajno veća (2,5%; $P = 0,004$) nego u kontrolnoj skupini (47).

Uočena je i značajna povezanost nekih neuroloških bolesti i potom pojave BP, što se objašnjava posljedicom imobilizacije i autoimunim zbivanjima uglavnom u bolesnika visoke životne dobi (1,47,49,50). Iako je BP opisan kod bolesnika s epilepsijom, lateralnom amiotrofičnom sklerozom i Shy-Draggerovim sindromom, njihova je povezanost nejasna (28,31,51). U jednoj je populacijskoj studiji potvrđena snažna povezanost BP s multiplom sklerozom (49,52). Također je potvrđena i značajna povezanost s Parkinsonovom bolešću, demencijom, unipolarnim i bipolarnim poremećajem te cerebrovaskularnim inzultom (52,53). Povezanost BP i neuroloških bolesti nije

do kraja razjašnjena. Pokušava se objasniti činjenicom da su BPAg1, tj. njegova izoforma (BPAg1-a), i BPAg2 izraženi u centralnom i perifernom živčanom sustavu i mišićima. Čini se da bi u pojedinim slučajevima BPAg1 mogao križno reagirati sa svojom izoformom i doprinijeti razvoju bolesti (41,49,54).

Nastanak buloznog pemfigoida mogu potaknuti i neki lijekovi, prvenstveno diuretici, nesteroidni protuupalni lijekovi, jod, D-penicilamin, antibiotici (ampicilin, amoksicilin, ciprofloksacin) i β -blokatori (55). U kontroliranim studijama potvrđena je statistički značajna korelacija između pojave BP i uzimanja antagonista aldosterona (prvenstveno spirinolaktona) i neuroleptika (fenotijazida) (56). Lijekovi koji sadrže sumpor, poput fursemida, također predstavljaju rizični faktor za BP, no ta je povezanost slabije evidentirana (57). Točan mehanizam nastanka BP uzrokovanog lijekovima nije poznat. Čini se da lijekovi mogu predstavljati okidač u genetski predisponiranih pojedinaca, bilo mijenjajući imunološki odgovor ili antigene na bazalnoj membrani (58). Stoga bi kod svih bolesnika s BP bilo nužno uzeti detaljne anamnestičke podatke o uzimanju lijekova, kako bi se uočio eventualni provocirajući faktor. Prestankom uzimanja lijeka koji je bio provocirajući faktor pojave BP dolazi do brzog nestanka kožnih promjena (1,31).

U nekim slučajevima izlaganje ultraljubičastom zračenju (UV) iz prirodnog i umjetnog izvora, radioterapija, opekline, mehanička traumatizacija i postoperativni ožiljci mogu provocirati pojavu BP. Iako mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni, čini se da je mehaničko oštećenje u području bazalne membrane osnova za reakciju autoprotutijela (31).

1.1.5. Klinička slika

Bulozni pemfigoid najčešće se prezentira napetim mjehurima na eritematoznim plakovima i često je prisutan osjećaj svrbeža. Početak BP može biti akutan ili subakutan, s nekoliko različitih kliničkih prezentacija (28,31). U buloznom stadiju nastaju mjehuri različitog broja, oblika i veličine, napetog pokrova na upalno promijenjenoj ili nepromijenjenoj koži. Uz to se

mogu vidjeti urtike i eritematozne papule, plakovi i ekcematoidne lezije. Mjehuri su napeti, 1 do 3 cm u promjeru ili veći, uglavnom ispunjeni bistrim, ponekad hemoragičnim sadržajem. Znak Nikolskoga I je negativan, dok znak Nikolskoga II (Asboe-Hansenov znak) može biti pozitivan (1,2). Mjehuri mogu perzistirati nekoliko dana prije nego puknu. Nakon pucanja, zaostaje erozija s hemoragičnom krustom, a promjena cijeli bez ožiljaka iz periferije i dlačnih folikula. Uglavnom zaostaju postupalne hiperpigmentacije i hipopigmentacije, a izuzetno rijetko milija. Promjene su simetrično raspoređene po trupu i proksimalnim dijelovima ekstremiteta. Iako su predilekcijska mjesta vrat, intertriginozna područja, prednje i medijalne strane natkoljenica i trbuh, morfe se mogu pojaviti na bilo kojem dijelu kože (Slika 1 i 2) (29).



Slika 1. Klinički izgled bolesnika s buloznim pemfigoidom – prebulozni stadij.



Slika 2. Klinički izgled bolesnika s buloznim pemfigoidom – bulozni stadij.

Pojedine lezije mogu biti anularnog i figuriranog izgleda, a neke nalikuju morfama eritema multiforme. U intertriginoznim područjima mogu se pojaviti vegetacije. Vlasište, jednjak, dušnik, te vidljive sluznice rijetko su zahvaćeni (28,29). Usna šupljina zahvaćena je promjenama u 10% do 30% bolesnika (28).

Određeni broj bolesnika u početnoj, prodromalnoj fazi prezentira se bez mjehura, nespecifičnom kliničkom slikom uz intenzivan subjektivan osjećaj svrbeža. U ne-buloznoj fazi mogu se naći urtikarijalne, eritematozne i ekcematizirane papule i žarišta, koja mogu biti prisutna tjednima i mjesecima, prije pojave prvih mjehura napetog pokrova, a ponekad predstavljaju jedinu manifestaciju BP (1,28,31). U švicarskoj prospektivnoj studiji, provedenoj na 164 bolesnika tijekom 2 godine praćenja, u trenutku dijagnoze 80% bolesnika imalo je lokaliziranu ili generaliziranu buloznu fazu bolesti. U ostalih 20% bolesnika nije bilo bula. Stoga je kod kroničnih, recidivirajućih, pruritičkih dermatoza u starijih bolesnika važno posumnjati na BP i učiniti obradu (18,28).

Razlikujemo nekoliko atipičnih, kliničkih varijanti BP: ne-bulozni BP, lokalizirani BP, vezikulozni BP, dishidroziiformni BP, nodularni pemfigoid, seborejički BP, pemfigoid vegetans, pigmentirani BP, eritrodermijski BP i juvenilni BP (25).

Ranije spomenuti ne-bulozni BP uglavnom predstavlja ranu fazu BP koja kasnije evoluirala u klasičan oblik. U nekih bolesnika se nikada ne pojave bule već perzistiraju pruritične papule, urtikarijalni plakovi i ekcematoidne morfe (31).

Lokalizirani BP rijedak je oblik kojega karakterizira pojava samo nekoliko mjehura na ograničenom području. Najčešće se javlja u području prethodne radioterapije, na paraliziranom ekstremitetu i u području postoperativnog reza, traume, opekline ili na koži u području stome. Također su opisani oblici na potkoljnicama (pretibijalni pemfigoid), umbilikalno i na grudima (59).

Vezikulozni BP je karakteriziran simetrično distribuiranim brojnim, izrazito pruritičnim, sitnim vezikulama napete površine na eritematoznoj ili urtikarijalnoj koži koje nalikuju na dermatitis herpetiformis ili linearnu IgA dermatozu (60).

Dishidroziiformni BP je oblik kod kojeg bolesnici imaju palmoplantarne vezikule, a dijagnoza se obično postavi u trenutku kada se mjehuri pojave negdje drugdje na tijelu ili nekom serološkom, dijagnostičkom metodom (1).

Nodularni pemfigoid izuzetno je rijedak oblik BP kod kojeg se u bolesnika nađu prurigo čavorići i papule uglavnom po ramenima, nadlakticama i natkoljnicama, a tek kasnije se razviju mjehuri na nodulima ili na klinički nepromijenjenoj koži (28,61).

Seborejički BP posebna je varijanta BP, od kojeg obolijevaju uglavnom žene, a bolest se prezentira eritemom i krustama na seborejičkim mjestima (1).

Pemfigoid vegetans varijanta je karakterizirana erodiranim plakovima vegetacija u intertriginoznim regijama, ponekad i u vlasištu. Taj oblik klinički nalikuje vegetirajućem pemfigusu (1).

Pigmentirani BP rijetka je varijanta karakterizirana pigmentiranim promjenama, na kojima se kasnije pojavljuju bulozne lezije (1).

Eritrodermijski BP najčešće je izazvan UV zračenjem, a karakteriziran je eritrodermijom tj. zahvaćenošću gotovo cijele kože sa ili bez pojave mjehura. Opisani su slučajevi ovog oblika nastali nakon provođenja fotokemoterapije (46).

Juvenilni BP ili BP dječje dobi rijedak je oblik BP (28). U dojenačkom periodu mjehuri se nalaze uglavnom na dlanovima i tabanima, stoga je nužno diferencijalno dijagnostički isključiti skabijes. U ovog oblika češća je zahvaćenost sluznice usne šupljine. Juvenilni BP uglavnom ima blaži klinički oblik i benigni tijek. Iako je etiologija BP dječje dobi nepoznata, lijekovi i cijepljenje smatraju se čimbenicima rizika (62).

U literaturi su opisani i neki pojedinačni slučajevi vrlo rijetkih formi BP. Tako je dijagnosticiran erozivni BP ili BP nalik toksičnoj epidermalnoj nekrolizi kod bolesnika s opsežnim, erozijama po koži bez subjektivnog osjećaja svrbeža, bula ili urtikarijalnih plakova (63). Opisan je BP s velikim ulceracijama, poput gangrene (25,64).

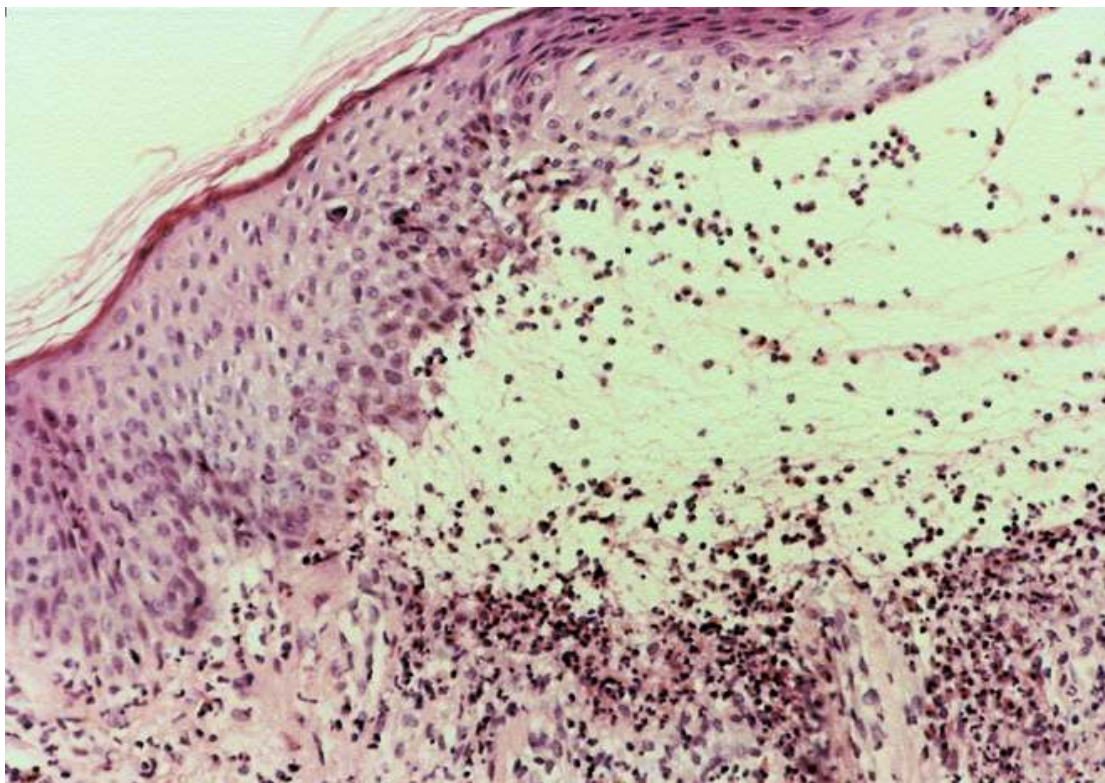
1.1.6. Dijagnostika

Postavljanje dijagnoze BP temelji se na detaljnoj anamnezi i kliničkom statusu, laboratorijskoj obradi u kojoj se koristi patohistološka analiza te nalaz direktne (DIF) i indirektna imunofluorescencije (IIF) (28,65).

Prema Joly-u i suradnicima, klinički kriteriji za postavljanje dijagnoze BP uključuju tri od četiri klinička kriterija (izostanak atrofije kože, nezahvaćenost sluznica, nepostojanje kožnih promjena na glavi i vratu, dob iznad 70 godina) i linearne depozite IgG i/ili C3 duž epidermodermalne granice na splitiranoj koži (66). Ipak, u nekim je slučajevima vrlo teško BP razlikovati od drugih subepidermalnih buloznih dermatoza (17).

Patohistološke karakteristike BP ovise o starosti lezije koja je biotirana. Idealan uzorak predstavlja makroskopski vidljiv mjehurić ili rub velikog mjehura. U ranoj ne-buloznoj fazi dominira dermalni edem i perivaskularni infiltrat limfocita i histiocita uz brojne eozinofile. U histološkoj slici svježeg

mjehura dominira subepidermalni mjehur, čiji pokrov čini cijeli, uglavnom intaktni epidermis (Slika 3) (67).



Slika 3. Patohistološka slika buloznog pemfigoida (HE x40).

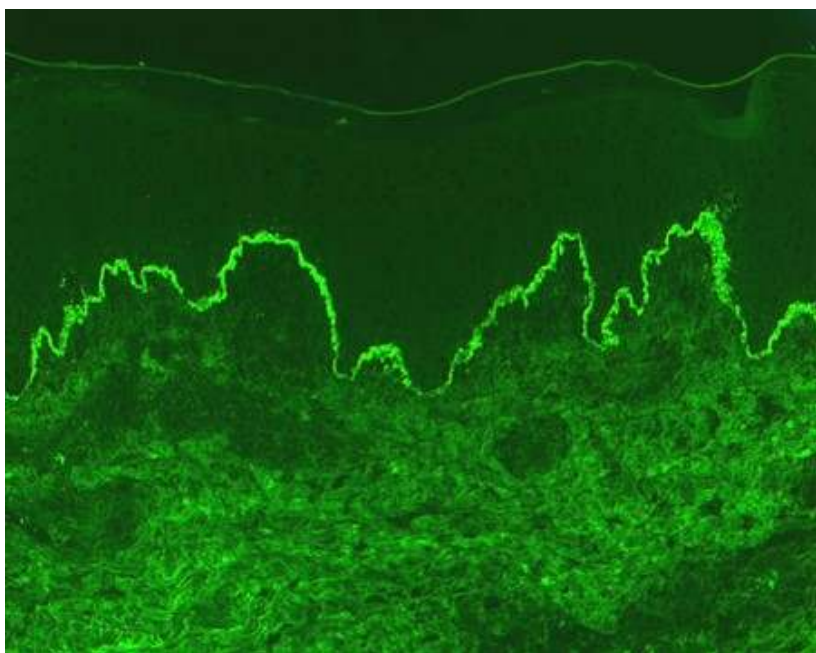
U isječku kože vidi se subepidermalna separacija i upalni infiltrat limfocita te eozinofilnih i neutrofilnih leukocita u papilarnom dermisu.

Tekućina koja ispunjava mjehur uglavnom sadrži fibrin i upalne stanice (eozinofile i neutrofile), bez akantolitičkih stanica. Prisutan je bogat perivaskularni infiltrat limfocita, neutrofila i eozinofila – BP bogat stanicama. U nekih bolesnika prevladava infiltrat neutrofila duž epidermodermalne granice, uz vakuolarnu degeneraciju. Neutrofili se mogu nakupljati i u vršcima dermalnih papila gdje tvore neutrofilne mikroapscese. Rjeđe nastaju mjehuri s oskudnim perivaskularnim infiltratom limfocita s pokojim eozinofilom – BP siromašan stanicama. Biopsija mjehura uzeta s upalno nepromijenjene kože može predstavljati diferencijalno dijagnostički problem za dermatohistopatologa osobito u slučajevima kada je BP potrebno razlikovati od stečene bulozne dermatoze (67,68).

U ranom urtikarijalnom stadiju BP, intraepidermalni eozinofili i opsežna spongioza mogu dovesti do razvoja intraepidermalnog mjehura. I kod biopsije

stare lezije može se naći intraepidermalni mjehur kao posljedica epidermalne regeneracije i epitelne migracije. Stoga je klasifikacija BP u subepidermalne bulozne dermatoze samo djelomično točna (68).

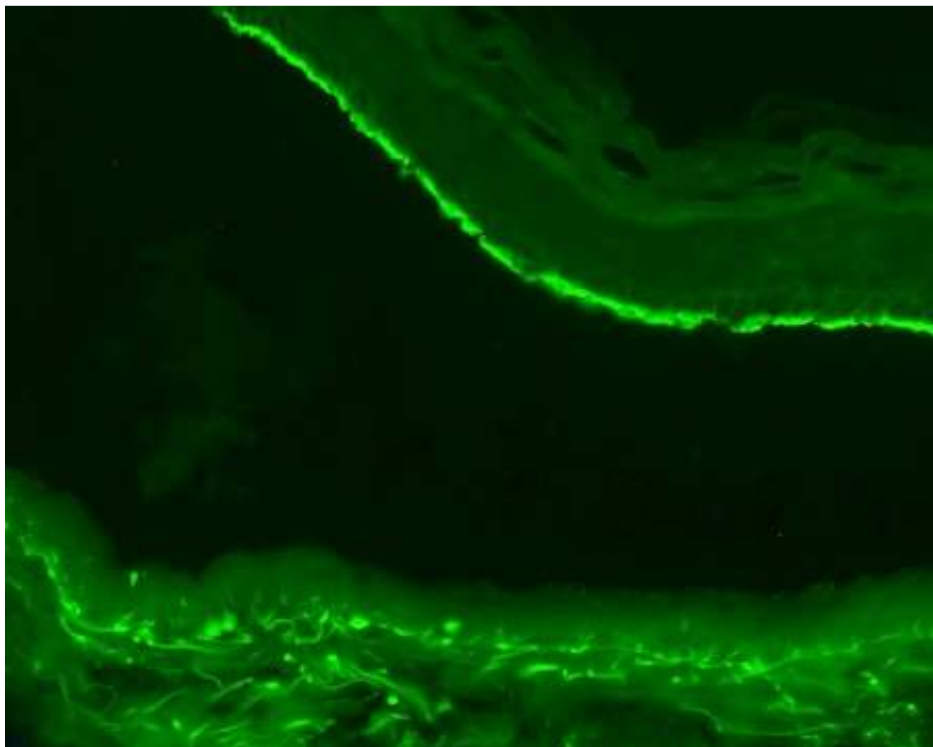
Direktnom imunofluorescencijom (DIF) bioptata perilezionalne kože nalazimo linearne depozite C3 komponente komplementa duž epidermodermalne granice u gotovo 80 do 90% bolesnika (Slika 4), u nešto manjem postotku i/ili depozite IgG, a kod malog broja bolesnika depozite IgE i IgA (1).



Slika 4. Direktna imunofluorescencija u bolesnika s buloznim pemfigoidom. Prisutni su depoziti IgG linearno duž epidermodermalne granice.

DIF na splitiranoj koži bolesnika (prethodno tretirana 1 mol/L otopinom NaCl) omogućuje razlikovanje bolesnika s BP od onih s epidermolysis bullosa acquisita (EBA) i anti-p200 pemfigoidom. Naime, kod bolesnika s BP nađu se depoziti na epidermalnoj strani ili na obje strane splitirane kože, dok se kod ovih drugih nađu samo na dermalnoj strani. Detaljni pregled uzorka linearne fluorescencije duž epidermodermalne granice također omogućuje orijentacijsko razlikovanje BP od drugih subepidermalnih buloznih dermataza. Naime, kod bolesnika s BP uočava se n-nazubljeni uzorak, a kod bolesnika s EBA nalazimo u-nazubljeni uzorak (1,69).

Indirektnom imunofluorescencijom (IIF) seruma bolesnika s BP dokazuju se cirkulirajuća IgG autoprotutijela linearno duž epidermodermalne granice u 60% do 80% bolesnika (Slika 5) (25).



Slika 5. Indirektna imunofluorescencija u bolesnika s buloznim pemfigoidom. U nalazu IIF na splitiranoj koži uočavaju se cirkulirajuća IgG protutijela na epidermalnoj i dermalnoj strani splitirane kože.

Ukoliko se kao supstrat upotrijebi ljudska splitirana koža, depoziti IgG se nađu na epidermalnoj strani u više od 90% bolesnika. Naime, najbolji supstrat IIF je zdrava koža u kojoj nakon tretiranja 1 mol/L otopinom NaCl u području epidermodermalne granice dolazi do separacije, tzv. „splitirane kože“. Splitirana koža puno je bolji supstrat od intaktne kože ili majmunskog jednjaka. U serumu bolesnika mogu se naći cirkulirajuća autoprotutijela IgA, IgE i IgM (25,28).

Enzim-vezani imunosorbentni test (ELISA, engl. enzyme-linked immunosorbent assays) metoda je kojom se određuje razina IgG autoprotutijela usmjerenih na BPAg1 i BPAg2 u serumu bolesnika s BP. ELISA BP 2 koristi rekombinantne proteine različitih dijelova BPAg2: imunodominantnu NC16A domenu, karboksi-terminalnu domenu ili cijelu ektodomenu. NC16A domena BPAg2 identificirana je kao imunodominantna

domena za IgG u bolesnika s BP. ELISA BP 2 je visoko osjetljiva metoda koja omogućuje višestruko testiranje uzorka, brza je, jednostavna i dobro standardizirana. ELISA BP 1 koristi rekombinantne proteine BPAg1, najčešće karboksi-terminalne fragmente. U odnosu na ELISA BP 2, ELISA BP 1 nešto je manje osjetljiva metoda (27,28,70,71).

Imunoelektronska mikroskopija, koja se sve rjeđe primjenjuje, omogućuje identifikaciju IgG protutijela uglavnom smještenih na vanjskoj strani bazalne membrane, ispod hemidezmosoma u području ekstracelularne domene BPAg2. Kod indirektno elektronske mikroskopije, cirkulirajuća autoprotutijela BPAg1 i BPAg2 vežu se u području hemidezmosoma i neposredno ispod njega u lamina lucida (65).

Imunoblot i imunoprecipitacija metode su koje su se ranije koristile za otkrivanje autoprotutijela BPAg1 i BPAg2 u kulturi keratinocita. Danas se ove metode koriste samo u znanstveno-istraživačke svrhe (17,65).

1.1.7. Diferencijalna dijagnoza

Diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze mnoge bulozne bolesti: stečena bulozna epidermoliza, linearna IgA dermatitoza, pemfigoid sluznica, vulgarni pemfigus i bulozni oblici medikamentnih egzantema i eksudativnog multiformnog eritema (1).

Prebuloznu fazu BP ponekad je teško razlikovati od cijelog niza dermatitoza poput medikamentnih reakcija, pruriga, kontaktnog alergijskog dermatitisa, urtikarije, urtikarije vaskulitisa, reakcije na ugriz insekta i skabijesa. Pri pojavi mjehura valja diferencijalno dijagnostički isključiti buloznu reakciju na ugriz insekta, buloznu medikamentoznu reakciju, bulozni oblik kontaktnog alergijskog dermatitisa, Steven-Johnson-ov sindrom i porfiriju kutaneu tarda. Kod djece, BP valja razlikovati od buloznog oblika impetiga, skupine nasljednih buloznih epidermoliza i buloznog oblika mastocitoze. Razlikovanje BP od bolesti iz skupine pemfigusa moguće je pomoću: kliničke slike (sluznička zahvaćenost, erozije, rjeđe mjehuri), citološkog obriska dna mjehura (pozitivan Tzankov test – akantolitičke stanice), patohistološke

analize (intraepidermalni, akantolitički, suprabazalni mjehur), DIF (intraepidermalna fluorescencija najčešće IgG i C3, rjeđe IgA, C4, C1q i IgM) i IIF (dokaz titra pemfigus protutijela, najčešće IgG klase) (2,28,31).

Stečena bulozna epidermoliza (EBA, lat. *epidermolysis bullosa aquisita*) kronična je, stečena, bulozna dermatoza koja se pojavljuje na koži i sluznicama na mjestima mehaničkog opterećenja. Koža cijeli ožiljcima. Iako je klinička slika vrlo raznolika, razlikujemo dva oblika: neupalni i upalni. Neupalni tip obilježen je pojavom mjehura i erozija na mjestima mehaničkog pritiska, koji cijele ožiljcima i milijama. U upalnom tipu promjene se pojavljuju spontano, na eritematoznoj ili urtikarijalnoj koži, uz intenzivan svrbež te cijele bez milija i atrofičnih ožiljaka. Ovaj se oblik diferencijalno dijagnostički lako povezuje s BP. U histološkom preparatu vidi se subepidermalni mjehur. U nalazu DIF se nađu granulirani depoziti duž epidermodermalne granice uglavnom C3 i IgG, rjeđe IgA i IgM. Sve navedeno ukazuje da je razlikovanje BP i EBA u nekim slučajevima vrlo teško. Stoga se za postavljanje dijagnoze EBA koristi DIF metoda splitirane kože bolesnika. U bolesnika s EBA u DIF se nalaze depoziti IgG na dermalnoj strani mjehura, a kod bolesnika s BP na epidermalnoj strani mjehura. Postavljanje točne dijagnoze za bolesnike s EBA važno je iz razloga što je ova bolest mnogo rezistentnija na terapiju od BP i često udružena s drugim autoimunim bolestima poput Crohnove bolesti, reumatoidnog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa i autoimunog tireoiditisa (2,29,72).

Linearna IgA bulozna dermatoza polimorfna je bulozna dermatoza karakterizirana subepidermalnim mjehurom i depozitima IgA klase duž epidermodermalne granice. Razlikujemo linearnu IgA dermatozu djece i odraslih. Više je ciljnih antigena od kojih je najvažniji BPAg2, posebno njegov 120kDa proteolitički fragment LAD1, te integrin $\alpha 6\beta 2$, laminin 332, kolagen VII, BPAg1, p200. Čini se kako je riječ o skupini subepidermalnih buloznih dermatoza, a ne samo o jednom entitetu. Klinička slika je raznolika. Na nepromijenjenoj ili eritematozno promijenjenoj koži pojavljuju se napeti mjehuri, često anularno, herpetiformno ili rozetiformno raspoređeni, posebno u djece. Gotovo identična klinička slika vidi se kod djece s BP. Predilekcijska mjesta su lice, perioralna i anogenitalna regija, a mogu biti zahvaćeni trup i

ekstremiteti. Sluznica usne šupljine zahvaćena je u oko 80% bolesnika i povećan je rizik za pojavu malignih limfoproliferativnih bolesti. U histološkoj slici vidi se subepidermalni mjehur, ponekad i intrapapilarni apscesi. U DIF nalazimo linearne depozite IgA duž epidermodermalne granice, a u serumu oko 50% do 60% bolesnika prisutna su IgA cirkulirajuća protutijela. U DIF splitirane kože IgA autoprotutijela mogu se vidjeti na epidermalnoj, dermalnoj i na obje strane mjehura, a u većini slučajeva vezana su za epidermalnu stranu mjehura (2,29,73).

Pemfigoid sluznica kronična je bulozna dermatozna koja zahvaća sluznicu usne šupljine i očiju, uz stvaranje ožiljaka. U većine bolesnika BPAg2 je ciljani antigen. U manjeg dijela bolesnika (25%) nađu se i kožne promjene, koje su identične BP, no uglavnom zahvaćaju glavu i gornji dio trupa te cijele ožiljkom. U histološkoj slici dominira subepidermalni mjehur, a u kasnim fazama fibroza i vaskularna proliferacija što odgovara ožiljku u kliničkoj slici. U DIF su prisutni depoziti IgG, C3 i IgA linearno duž epidermodermalne granice, a u IIF su kod oko 50% bolesnika prisutna cirkulirajuća protutijela usmjerena prema bazalnoj membrani. U bolesnika s kožnim promjenama i promjenama na sluznici usne šupljine pemfigoid sluznice teško se razlikuje od BP. Točna dijagnoza posebno je važna za bolesnike s pemfigoidom sluznica, jer je kod njih povećana pojava adenokarcinoma (pluća, želuca, debelog crijeva, uterusa) pa je nužno učiniti detaljnu obradu i planirati redovite kontrole (2,47,74).

1.1.8. Liječenje

Prvu liniju u liječenju BP predstavljaju imunosupresivi, a počinju se primjenjivati i novi lijekovi koji ciljano djeluju na različite faze u patogenezi bolesti. Terapija BP velikim dijelom ovisi o proširenosti bolesti i općem stanju bolesnika, a temelji se na srednjim dozama sistemskih kortikosteroida (KS) (0,5 mg prednizolona po kilogramu tjelesne mase). Ipak, primjena kortikosteroida, uglavnom u bolesnika starije životne dobi, vezana je uz pojavu brojnih nuspojava (28,31).

BP je kronična bolest s fazama egzacerbacije i spontane remisije. U bolesnika s ograničenom bolešću preporuča se lokalna terapija visokopotentnim KS. Primjena 40 g na dan visokopotentnih KS na kožu čitavog tijela pokazala se učinkovitom u liječenju srednje teških i teških oblika BP. Joly i suradnici su u komparativnoj studiji na 341 bolesniku sa srednje teškim i teškim oblikom BP potvrdili veću učinkovitost visokopotentnih, lokalnih KS u odnosu na peroralne (75). Ista grupa autora provela je i multicentrično, randomizirano ispitivanje na 311 bolesnika s BP kako bi utvrdila imaju li niže doze lokalnih KS isti učinak na kontrolu bolesti kao i visoke. Rezultati su nedvojbeno pokazali da je primjena 10 do 30 g/dan klobetazol propionat kreme uz postupno snižavanje tijekom četiri mjeseca jednako učinkovita kao i peroralna primjena 40 g/dan uz snižavanje doze KS tijekom 12 mjeseci. Dodatno, bolesnici sa srednje teškim oblikom BP na srednjim dozama lokalnog KS imali su dva puta niži rizik za smrtnost i razvoj po život opasnih nuspojava u odnosu na bolesnike na visokim dozama (76). Iako bi se moglo zaključiti da su ti dobri učinci lokalne terapije posljedica sistemske apsorpcije KS, primjena 30 g/dan klobetazol propionat kreme apsorpcijski odgovara 45 mg/dan peroralnog prednizolona. Usprkos dobrom učinku, lokalna terapija KS ima i velike nedostatke. Naime, primjena velike doze lokalnih KS kod bolesnika koji su najčešće u visokoj dobi teško je izvediva i vezana je uz visoke troškove. Stoga se lokalna primjena visokopotentnih KS većinom preporuča za lokalizirani oblik BP (2,5).

Za teške oblike BP sistemski KS su i nadalje zlatni standard u liječenju. Morel i suradnici su u multicentričnoj randomiziranoj studiji utvrdili da primjena visokih doza prednizolona (1,25 mg/kg na dan) nema bolji učinak od srednje visokih doza (0,75 mg/kg) (77). Dreno i suradnici pokazali su da nema razlike u terapijskom odgovoru primijeni li se u liječenju bolesnika s BP metilprednizolon (1,17 mg/kg) ili prednizolon (1,16 mg/kg). Jedino statistički značajno ($P < 0.05$) smanjenje svrbeža uočeno je kod bolesnika liječenih metilprednizolonom (78). Pulsna, intravenska primjena metilprednizolona pokazala se učinkovita u zaustavljanju bulozne reakcije. Važno je napomenuti da je primjena KS, posebno u bolesnika visoke dobi, povezana s velikim rizikom za razvoj nuspojava. Prvenstveno su to: steroidni dijabetes, osteoporoza, hipertenzija, katarakta, glaukom, želučani vried i razne infekcije.

Stoga se savjetuje primjena nižih doza KS, u početnoj dozi od 0,5 mg/kg prednizolona kojima se uglavnom postiže kontrola bolesti. S redukcijom doze većinom se započinje nakon tri do četiri tjedna, nakon što kod bolesnika više nema svježih mjehura, a eritem počne blijediti. Postupno se tjedno snižava doza po 5 mg, a moguće je primijeniti dozu po alternativnoj shemi svaki drugi dan. Snižavanje doze mora biti u potpunosti usklađeno s kliničkim tijekom bolesti i nakon pet do šest mjeseci terapija se može ukinuti. Cilj liječenja bolesnika s BP je redukcija kumulativne doze KS. Stoga je potrebno redovito kontrolirati bolesnike. Kada KS ne postižu željeni učinak u terapiju se uvode drugi imunosupresivni lijekovi kao što su azatioprin, mikofenolat mofetil, metotreksat i ciklofosfamid. Izbor imunosupresivnog lijeka ovisi o općem stanju bolesnika, rizičnim faktorima, iskustvu liječnika i cijeni lijeka (2,79,80).

Azatioprin je učinkovit u kombinaciji s KS. Iako u liječenju BP nema dokazanog učinka na kontrolu bolesti, primjenjuje se radi smanjenja nuspojava KS. Budući da djelovanje lijeka započinje četiri do šest tjedana nakon početka uzimanja, potrebno je prilagoditi dozu KS. Najozbiljnija nuspojava primjene ovog lijeka je mijelosupresija. Čini se da je ona posljedica aktivnosti tiopurin metiltransferata (TPMT). Naime, azatioprin se u organizmu neenzimatski pretvara u 6-merkaptopurin i dalje u aktivni metabolit, 6-tiogvanin, koji dovodi do oštećenja limfocita. TPMT je enzim koji pretvara 6-merkaptopurin u neaktivni metabolit. Kod bolesnika koji imaju nisku razinu TPMT ili im nedostaje, dolazi do povećanja pretvorbe 6-merkaptopurina u aktivni metabolit i posljedičnog oštećenja koštane srži. Stoga je kod bolesnika sa sniženom funkcijom TPMT nužno reducirati dozu azatioprina, dok kod bolesnika s vrlo niskom aktivnošću TPMT azatioprin nije lijek izbora. Neki lijekovi, kao što su alopurinol i sulfasalazin, inhibiraju TPMT i povećavaju mijelotoksičnost. Druge nuspojave azatioprina su mučnina, povraćanje, hepatitis, pankreatitis i infekcije (79-82).

Mikofenolat mofetil (MMF) prvenstveno je lijek za kontrolu reakcije odbacivanja presatka kod transplantiranih bolesnika. Mehanizam djelovanja temelji se na hidrolizi u aktivni metabolit mikofenoličnu kiselinu koja selektivno inhibira inozin monofosfat dehidrogenazu i inhibira sintezu purina u B i T limfocitima. Kod nekih bolesnika s BP MMF je primijenjen uz dobar učinak.

Uglavnom se primjenjuje u kombinaciji s KS radi smanjenja kumulativne doze i kao monoterapija (79). U randomiziranoj kontroliranoj studiji na 73 bolesnika s BP uspoređena je sigurnost i učinkovitost kombinirane terapije KS (u dozi 0,5 mg/kg/d) s aztioprinom (2 mg/kg/d) u odnosu na KS (u dozi 0,5 mg/kg/d) s MMF (1 g – dva puta dnevno). U obje skupine pokazala se ista učinkovitost u postizanju potpune remisije, trajanju remisije i istoj kumulativnoj dozi KS. Obje kombinacije pokazale su se jednako djelotvornima, a u skupini koja je dobivala azatioprin kod većeg se broja bolesnika razvila hepatotoksičnost. Ipak, valja naglasiti kako je cijena azatioprina značajno niža od cijene MMF (83). MMF se primjenjuje u dozi od 1000 mg dva puta dnevno, uglavnom u kombinaciji s KS. Ukida se po postizanju remisije zajedno s KS ili nakon redukcije KS. Nuspojave MMF su uglavnom blage i lijek se dobro podnosi. Najčešće nuspojave su proljev, mučnina, povraćanje, infekcija, leukopenija i anemija. Neki lijekovi, poput kolestiramina, $Mg(OH)_2$ i $Al_2(OH)_3$ mogu sniziti apsorpciju MMF, dok aciklovir i ganciklovir povećavaju koncentraciju u krvi zbog smanjenog izlučivanja (79).

Ciklofosfamid je sintetski alkilirajući spoj koji se u jetri metabolizira u aktivne metabolite koji se vežu za DNK, koče replikaciju i dovode do smrti stanice. Ciklofosfamid je primijenjen u nekoliko sporadičnih, terapijski rezistentnih slučajeva BP. Brojne su nuspojave ove terapije. Među ozbiljnije nuspojave ubrajaju se mijelosupresija i pojava hemoragičnog cistitisa u gotovo 40% bolesnika. Kod bolesnika na terapiji ciklofosfamidom često se javlja mučnina, povraćanje, proljev, abdominalna bol, hiperpigmentacije kože i alopecija. Toksično djelovanje na gonade dovodi do amenoreje, azoospermije i neplodnosti (80,82).

Metotreksat je antimetabolit, potuupalni i imunosupresivni lijek, koji inhibicijom redukcije folne kiseline, dovodi do poremećaja u sintezi DNK, RNK i proteina. Opisano je nekoliko uspješnih primjena niskih, tjednih, doza metotreksata u kombinaciji s KS. U studiji provedenoj na 11 bolesnika, kod osam bolesnika postignuta je kontrola bolesti niskim dozama (0,5 mg tjedno), dok su kod tri bolesnika bile potrebne više doze metotreksata (10 do 12,5 mg tjedno) (80). Metaanaliza šest studija primjene metotreksata kod ukupno 79 bolesnika s BP potvrdila je kliničko poboljšanje u 94% slučajeva (79). U istraživanju Kjellmana

i suradnika 98 bolesnika liječenih metotreksatom postigli su raniju remisiju bolesti od 40 bolesnika koji su bili samo na KS terapiji (84). Najčešće nuspojave terapije metotreksatom su mučnina, povraćanje, fotosjetljivost, pancitopenija i hepatotoksičnost. Zbog toga su nužne redovite kontrole krvne slike i jetrene funkcije, a nakon postignute doze od 1,5 g preporuča se učiniti UZV jetre i eventualno biopsija (82,84).

Primjena diaminodifenilsulfona kod bolesnika s BP uglavnom je opisana u malim studijama. Metaanaliza šest takvih studija, provedenih na ukupno 170 bolesnika, potvrdila je kliničko poboljšanje u 81% bolesnika. Kombinacija diaminodifenilsulfona s KS pokazala se učinkovitijom od monoterapije. Najčešće nuspojave su methemoglobinemija i hemoliza. Methemoglobinemija se pojavljuje u gotovo svih bolesnika na terapiji, a postaje klinički značajna kada povisi 30% od normalne vrijednosti. Primjena 1 g vitamina C preporuča se radi prevencije methemoglobinemije. Prije uvođenja terapije potrebno je isključiti deficit glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, s obzirom da nedostatak tog enzima povećava rizik hemolize (79,80).

Uspješna primjena tetraciklina i eritromicina u liječenju BP opisana je u nekim sporadičnim slučajevima, no sve je više radova koji tu učinkovitost opovrgavaju (28).

Plazmafereza se pokazala učinkovitom u izuzetno rezistentnim slučajevima. Pomoću plazmafereze uklanja se dio autoprotutijela s plazmom. Važno je spomenuti iznimno visoku cijenu ove terapije i nužnost provođenja u bolničkim uvjetima zbog mogućeg razvoja komplikacija (80).

Intravenski imunoglobulini primjenjuju se kod terapijski najrezistentnih oblika BP. Iako mehanizam djelovanja nije u potpunosti jasan, čini se da reduciraju cirkulirajuća autoprotutijela povećavanjem njihovog katabolizma. Nuspojave koje prate ovu terapiju su anafilaksija, infekcije, tromboza i bubrežno zatajenje (79).

Primjena rituksimaba (anti-CD20 monoklonskog protutijela) u BP ograničena je na mali broj bolesnika. Prvi povoljan učinak, to jest potpuna remisija BP, zabilježen je kod dva bolesnika koji su zbog kronične limfatične leukemije

liječeni rituksimabom. Ohrabreni ovim rezultatima, počela je primjena rituksimaba kod bolesnika s rezistentnim oblikom BP, s različitim učinkom (79,85).

Omalizumab je monoklonsko anti-IgE protutijelo. Spoznavanje uloge IgE u lezijama BP pokrenulo je veliki interes za primjenu ovog lijeka. Do sada je objavljeno nekoliko sporadičnih primjena kod bolesnika s BP, a očekuje se randomizirano kliničko ispitivanje učinkovitosti ovog lijeka (79).

1.1.9. Prognoza i mortalitet

BP je bolest starije životne dobi. Bolesnici s BP imaju značajno smanjenu kvalitetu života, budući da bolest često prati snažan osjećaj svrbeža, razvoj bula i erozija po koži koje se često sekundarno inficiraju, a i sama terapija KS rezultira brojnim nuspojavama (17,28). Dosta je različitih podataka u literaturi vezanih uz mortalitet, što je većinom posljedica nekonzistentnih uključnih kriterija u različitim studijama. Schmidt i suradnici utvrdili su jednogodišnji mortalitet od 6% u 62 bolesnika (medijan 76 godina) liječenih metilprednizolonom, dapsonom i klobetazol propionat kremom 6% (17). Joly i suradnici su u svom istraživanju koje je uključilo 312 bolesnika, prosječne dobi od 82 godine, liječenih klobetazol propionat kremom utvrdili jednogodišnji mortalitet od 39% (76). Langan i suradnici objavili su da je jednogodišnji rizik mortaliteta 2,3 puta veći među bolesnicima s BP nego u populaciji iste dobi i spola koji nemaju BP (16). U prospektivnoj studiji provedenoj na 60 bolesnika, Cortes i suradnici utvrdili su mortalitet u prvoj godini bolesti 26,7%, a 60,8% nakon 5 godina bolesti (86). Starija životna dob i demencija u BP bolesnika bili su loši prognostički faktori (87). Nije do kraja jasno je li taj relativno visok mortalitet posljedica visoke životne dobi i pratećih bolesti ili je vezan i uz primjenu immunosupresivne terapije, prvenstveno KS. Parker i MacKelfresh smatraju da upravo KS povisuju mortalitet kod ovih bolesnika (88). Joly i suradnici su u velikoj (N = 341), kontroliranoj, randomiziranoj studiji potvrdili veću učinkovitost visoko potentnih lokalnih KS u odnosu na peroralne, te značajno nižu stopu ozbiljnih nuspojava i mortalitet u skupini bolesnika liječenih lokalnom terapijom. U bolesnika s teškim oblikom BP liječenih

peroralnim KS jednogodišnje preživljenje je bilo 58%, dok je među bolesnicima s teškim oblikom BP liječenih lokalnim kortikosteroidima iznosilo 76% (75). U poredbenoj studiji primjene standardne doze (40 g/dan) s nižim dozama (10 – 30 g/dan) lokalnih KS nije uočena razlika u mortalitetu između ove dvije ispitivane skupine. Kada su podaci uspoređeni sa studijom iz 2002. godine te je uzeta u obzir dob i opće stanje bolesnika, u skupini bolesnika liječenih niskim dozama KS uočena je značajno niža stopa po život opasnih nuspojava i mortaliteta (76). Roujeau i suradnici utvrdili su jednogodišnje preživljenje u 58% bolesnika s BP, dok je istraživanje Parkera i suradnika utvrdilo 76%-tno jednogodišnje preživljenje (89,90). Američka studija Colberta i suradnika pokazala je jednogodišnje preživljenje bolesnika s BP od 89% (91). U komparaciji s francuskom studijom kod koje je jednogodišnje preživljenje iznosilo 76% i 58%, rezultati američke studije su značajno različiti. Ta velika razlika vjerojatno je posljedica činjenice da je francuska grupa ispitivača obuhvatila sve bolesnike u Francuskoj, uključujući i one u teškom stanju. Američki ispitivači su u svoje ispitivanje uključili polikliničke bolesnike, koji su dolazili na ambulantno liječenje i bili boljeg općeg stanja. Ispitivanje Langan i suradnika u Velikoj Britaniji utvrdilo je godišnji mortalitet od 19% (16). Joly i suradnici utvrdili su rizične faktore za letalan ishod u prvoj godini bolesti. Oni uključuju visoku životnu dob (stariji od 80 godina), dozu prednizolona pri otpustu veću od 37 mg, snižene albumine u serumu (ispod 3,6 g/dL), ubrzanu sedimentaciju eritrocita (300 mm/h) i Karnofsky skor 40 ili niži (76).

1.2. Građa bazalne membrane kože

Bazalna membrana (BM) kože je ultrastrukturalno definiran sloj koji se nalazi između vanjskog sloja kože – epidermisa i unutarnjeg sloja kože – dermisa. Glavna uloga joj je međusobno povezivanje ova dva sloja. Uz to, BM služi kao potpora stanicama epitela, tvori filtracijsku barijeru za makromolekule, sprječava dehidraciju i gubitak elektrolita, tvori zaštitu i sprječava prodor mikroorganizama. Histološki je BM definirana kao 0,5 – 1 μm tanka, trakasta struktura između epidermisa i dubljih struktura, a boji se PAS pozitivno. Većina komponenti bazalne membrane otkrivena je tijekom istraživanja različitih autoimunih poremećaja. Naime, istraživanja autoimunih bolesti i molekularna dijagnostika ciljnih molekula dovela je do izolacije pojedinih strukturnih komponenti BM i proteina od kojih su izgrađene, što je rezultiralo današnjim poznavanjem strukture i funkcioniranja BM. Epidermalna bazalna membrana kože sastoji se od brojnih proteina od kojih jedni nastaju iz bazalnih keratinocita, a drugi iz dermalnih fibroblasta (92-94).

BM možemo podijeliti na četiri ultrastrukturalno različita dijela: hemidezmosome, elektronsko mikroskopski proziran sloj, tzv. lamina lucida, lamina densa te sublamina densa. Te su podregije identificirane elektronskom mikroskopijom fiksiranog preparata kože. Istraživanja bazalne membrane kože sugeriraju da je lamina lucida zapravo artefakt nastao dehidriranjem kože. Pri istraživanju modela bazalne membrane kože i dalje se služimo podjelom na četiri podjedinice, iako je krajnje kontroverzna (73).

1.2.1. Hemidezmosomi

Hemidezmosomi (HD) su elektronski gusta, zadebljana područja duž bazalne membrane stanica temeljnog sloja kože. S unutarnje strane bazalnih keratinocita tvore intracitoplazmatski plak na koji konvergiraju intracelularni keratinski filamenti (tonofilamenti), a s vanjske strane bazalnih stanica u lamina lucida protežu se sidrena vlakanca. HD i sidrena vlakanca vezuju bazalne stanice s bazalnom membranom, dok ih sidrena vlakanca vezuju za papilarni dermis. Intracelularni tonofilamenti koje tvore keratin 5 i 14 sudjeluju

u održavanju citoskeleta bazalne stanice. Ovi keratinski intracelularni filamenti vezuju se za plektin i BPAg1, dva intracelularna proteina HD. Druge komponente HD čine transmembranski proteini BPAg2 i integrini (73,93,94).

1.2.1.1. Antigen buloznog pemfigoida 1

Antigen buloznog pemfigoida 1 (BPAg1) je 230 kDa intracelularni protein iz obitelji plakina, koji sudjeluje u adheziji intermedijarnih filamenata keratinocita za HD. Sastoji se od globularnog karboksi-terminalnog dijela kojim se veže za keratinske intermedijarne filamente i amino-terminalnog dijela kojim se veže uz citoplazmatsku domenu BPAg2, integrinsku podjedinicu $\beta 4$ i ERBIN (protin koji se vezuje na transmembranski tirozin kinaza receptor Erb-B2). BPAg1 ima ključnu ulogu u citoskeletnoj organizaciji. Opisani su blagi oblici epidermolysis bullosa simplex, kao posljedica mutacije gena koji kodira epitelnu izoformu BPAg1. Bolesnici s BP razvijaju autoprotutijela usmjerena prema BPAg1 i dovode do subepidermalne separacije. Ista autoprotutijela dokazana su i kod bolesnika s buloznim oblikom sistemskog eritemskog lupusa (95-97).

1.2.1.2. Antigen buloznog pemfigoida 2

Antigen buloznog pemfigoida 2 (BPAg2), nekada nazivan kolagen XVII i BP180, transmembranski je protein koji se sastoji od intracelularne domene, transmembranskog segmenta i ekstracelularne domene. Intracitoplazmatski kraj BPAg2 sastoji se od oko 500 aminokiselina koji tvore globularnu glavu, a ekstracelularni dio čini petnaest glicin-x-y aminokiselinskih sekvenci koje se ponavljaju čineći fleksibilni rep koji dopire do lamina densa, vraća se i završava svojim karboksilnim dijelom u lamina lucida. BPAg2 postoji u dva oblika, 180 kDa proteina pune dužine i 120 kDa ekstracelularne domene koja nastaje pod utjecajem proteolize u membrani bazalnih stanica. Ti su procesi posredovani disintegrinima i metaloproteinazama, osobito konvertirajućim enzimom faktora tumorske nekroze α . Fosforilacija BPAg2 pomoću ekto-kazein kinaze 2 inhibira njegovu proteolizu i na taj način mijenja adheziju i mobilnost bazalnih keratinocita. Nakon aktivacije, citoplazmatska domena

BPAg2 vezuje se za BPAg1, integrinsku podjedinicu $\beta 4$ i plektin. Ekstracelularni segment BPAg2 sastoji se od kolagene domene koja je isprekidana sa 16 malih nekolagenskih (NC16) dijelova. Najveća od nekolagenskih domena (NC16A) veže se na integrinsku podjedinicu $\alpha 6$, dok se karboksi-terminalni dio BPAg2 veže s lamininom 332. Na ovaj se način povezuju HD i lamina densa. Mutacija gena koji kodira BPAg2 dovodi do epidermolysis bullosa junctionalis non Herlitz. Kod bolesnika s BP ekstracelularna NC16A domena predstavlja glavni epitop za autoprotutijela. Centralni dio i fleksibilni rep BPAg2 regije su epitop za autoprotutijela kod bolesnika s linearnom IgA dermatozom, dok karboksi-terminalni dio predstavlja epitop za autoprotutijela kod bolesnika s pemfigidom sluznica (33,96,98-100).

1.2.1.3. Integrini

Integrini su transmembranski receptori koji sudjeluju u međustaničnoj interakciji kao i onoj između stanice i matriksa. Vezivanjem nekog liganda na integrin receptor pokreću se procesi stanične adhezije, transporta signala, genske ekspresije i rasta. Svi integrini su $\alpha\beta$ heterodimeri, a identificirane su brojne α i β podjedinice. Obje podjedinice su transmembranski glikoproteini koje tvore hidrofobnu transmembransku domenu i malu citoplazmatsku domenu s manje od 50 aminokiselina. Izuzetak predstavlja $\beta 4$ podjedinica s velikom intracelularnom domenom s više od 1000 aminokiselina. Upravo je integrin $\alpha 6\beta 4$ isključivo smješten u HD. Čini se da je upravo velika citoplazmatska domena integrinske podjedinice $\beta 4$ odgovorna za vezivanje HD. Citoplazmatski dio direktno je vezan uz plektin, a distalni karboksi-terminalni dio se veže za BPAg2. Podjedinica $\alpha 6$ svojim se proksimalnim dijelom veže za NC16A regiju BPAg2, a distalnim se dijelom s velikim afinitetom veže za laminin 332. Na taj način integrin $\alpha 6\beta 4$ pomaže vezivanju laminina 332 izvan stanice s keratinskim filamentima (tonofilamentima) unutar stanice te kontrolira organizaciju laminina 332 i adheziju, migraciju i proliferaciju keratinocita. Drugi nehemidezmosomski integrini, koji se nalaze na bazalnim keratinocitima su $\alpha 2\beta 1$ i $\alpha 3\beta 1$, a vežu se uz stanični citoskelet i

imaju značajnu ulogu u međustaničnoj adheziji. Mutacija gena koji kodiraju integrin $\alpha 6\beta 4$ dovode do razvoja epidermolysis bullosa s piloričkom atrezijom koja je karakterizirana niskom, bazalnom, epidermalnom separacijom (95,101,102).

1.2.1.4. Plektin

Plektin je 500 kDa protein iz obitelji plakina i sastavni je dio citoplazmatskog dijela HD-a. Predstavlja dimer koji se sastoji od dvije velike globularne strukture povezane dvostrukom uzvojnicom. Plektin ima izuzetno važnu ulogu u povezivanju tonofilamenta s HD bazalnih keratinocita (prvenstveno za BPAg2 i integrin $\alpha 6\beta 4$), ali i unakrsno povezuje ostale proteine citoplazmatskog plaka i HD. U slučaju nedostatka plektina, dolazi do intraepidermalne separacije u području HD, što rezultira pojavom epidermolysis bullosa simplex. Autoprotutijela usmjerena prema plektinu utvrđena su i u paraneoplastičnom pemfigusu (2,96).

1.2.2. Lamina lucida

Lamina lucida je elektronskomikroskopski proziran sloj između hemidezmosoma i lamina densa. Kao što je već spomenuto, postojanje tog sloja danas je vrlo kontroverzno: dio autora ga prihvaća, a dio ga smatra artefaktom nastalim prilikom laboratorijskog fiksiranja kože. Ipak se u svim dijagramima i shemama navodi sa svojim sastavnim dijelovima. U ovom sloju uočavaju se sidrena vlakanca koja se od hemidezmosoma protežu do lamina densa, vraćaju se i završavaju u lamina lucida (93).

1.2.3. Lamina densa

Svoje ime zahvaljuje gustom izgledu pod elektronskim mikroskopom, a debljine je 35 do 45 nm. Osnovni sastavni dijelovi lamina densa su kolagen tipa IV, laminini, nidogen i heparan sulfat proteoglikani (73,95).

1.2.3.1. Kolagen tipa IV

Ovaj tip kolagena isključivo se nalazi u bazalnoj membrani. Građen je poput trostruke uzvojnice, ali za razliku od ostalih tipova kolagena nije takav cijelom dužinom. Kratki prekidi ponavljanja glicin-X-Y unutar uzvojnice tvore nestabilnost te domenu čine fleksibilnom. Zahvaljujući globularnoj strukturi na kraju uzvojnice, kolagen IV podsjeća na prokolagen. Amino terminalni dio većeg globularnog dijela naziva se 7S, a karboksi terminalni dio manje globularne strukture naziva se nekolagena domena 1 (NC1). Pri opisu makromolekularne strukture, kolagen tipa IV često se uspoređuje s „hokejskom palicom“, pri čemu lopatici odgovara amino-terminalna S7 domena, vratu palice trostruka uzvojnica, a dršci manja karboksi-terminalna globularna domena NC1. Unutar lamina densa, kolagen tipa IV tvori strukturu poput mreže pauka, gdje četiri S7 domene – „lopatice hokejske palice“ – centralno tvore tijelo pauka. Trostruke fleksibilne uzvojnice („vratovi palica“) su orijentirani gotovo pod pravim kutom i s NC1 karboksi-terminalnim domenama oblikuju njegove noge. Na NC1 domenu veže se NC1 domena drugog „pauka“ kojeg tvore druga četiri kolagena tipa IV. Takvim nizanjem nastaje dvodimenzionalna rešetka koja je osnovni matriks lamina densa. Poremećaji kolagena IV rezultiraju brojnim bolestima, kao što su Alportov sindrom, Goodpasture-ova bolest i druge (73,95).

1.2.3.2. Laminini

Laminini predstavljaju skupinu heterotrimeru građenih od tri lanca glikoproteina (podjedinice α , β i γ) koji su učvršćeni stabilnim disulfidnim vezama. Do sada je identificirano pet α , tri β i tri γ podjedinice, a različite izoforme nastaju spajanjem različitih α , β i γ podjedinica. Sintetiziraju ih keratinociti i do sada je identificirano 15 članova obitelji laminina. U bazalnoj membrani služe kao ligandi i naliježu na površinske stanične receptore (npr. integrine) te omogućuju prenošenje signala važnih za održavanje epitelne adhezije, migracije i proliferacije. Od 2005. godine, uvedena je nova

nomenklatura laminina koja je zamijenila staru podjelu temeljenu na redosljedu kojim su otkriveni (npr. laminin 1, 2, 3, i td.). Novo nazivlje uključuje broj α , β i γ podjedinica, tj. njihovu građu. Tako laminin nekada poznat pod nazivom laminin 5, građen od $\alpha 3\beta 3\gamma 2$, danas nazivamo laminin 332 (73,93).

Upravo su laminin 332, laminin 311 i laminin 511 najzastupljeniji u bazalnoj membrani epidermisa. Laminin 332 odgovoran je za prijanjanje bazalnih keratinocita na bazalnu membranu. Kako laminin 332 ne posjeduje podjedinicu $\gamma 1$ potrebnu za vezivanje s nidogenom, svojim N-terminalnim dijelom kovalentno se veže za laminin 311 i 321 tvoreći mjesto za vezivanje nidogena. Sa $\alpha 3$ podjedinicom veže se za integrin $\alpha 6\beta 4$ u HD. Laminin 311 svojom $\gamma 1$ podjedinicom vezuje se disulfidnim vezama za nidogen, a preko njega na kolagen tipa IV, fibulin 1 i perlekan te ostale molekule lamina densa. Laminin 511 tvori endotelne stanice krvnih žila dermisa, ima ključnu ulogu tijekom angiogeneze te kao ligand proliferacije i migracije tijekom cijeljenja rane. Mutacije laminina 332 povezane su s razvojem epidermolysis bullosa junctionalis Herlitz (31,73,95).

1.2.3.3. Nidogen

Nidogen, prije poznat kao entaktin, 150 kDa je glikoprotein smješten u lamina densa. Osnovna mu je funkcija povezivanje kolagena tipa IV s različitim lamininima. Sastoji se od dvije amino-terminalne domene G1, G2 i karboksiterminalne domene G3. Svojom G3 domenom visokim se afinitetom veže za laminine koji sadrže $\gamma 1$ podjedinicu, poput laminina 111, 311, 511. Amino-terminalnom domenom G2 nidogen se veže za kolagen tipa IV. Sklonost vezivanja nidogena i laminina smatra se jednom od najjačih u prirodi. Tako vezani nidogen s lamininom može se vezati i za centralni protein heparan sulfat proteoglikana te fibulin 1 i 2. Uloga nidogena je stabilizacija brojnih molekula u lamina densa (73,95).

1.2.3.4. Heparan sulfat proteoglikani

Riječ je o heterogenoj skupini makromolekula koje se sastoje od centralnog proteina s postraničnim glikozaminoglikanom u obliku „četke za bocu“. Različiti tipovi heparan sulfat proteoglikana (HSPG) nalaze se u bazalnim membranama različitih tkiva. Perlekan je najkarakterističniji HSPG za bazalnu membranu epidermisa. Čini ga centralni protein (400-450 kDa) s pet različitih postraničnih domena. Centralnim proteinom vezuje se za G2 domenu nidogena i kolagen tipa IV. Perlekan je važan u vezivanju brojnih komponenti bazalne membrane, faktora rasta i receptora. Zahvaljujući tome ima ključnu ulogu u razvoju brojnih tkiva, angiogenezi, neurogenezi, hondrogenezi i stvaranju kardiovaskularnog tkiva. Zbog visokog sadržaja sulfata, HSPG odgovorni su za negativan naboj i hidrofobnost bazalne membrane, što rezultira njihovom ograničenom propusnošću (95).

1.2.4. Sublamina densa

Čine ju vlaknaste strukture koje lamina densa povezuju s dermalnim strukturama. To su sidrena vlakanca, čija je glavna komponenta kolagen tipa VII (73,95).

1.2.4.1. Kolagen tipa VII

Kolagen tipa VII građen je od tri identična 290 kDa α lanca i glavni je sastavni dio sidrenih vlakanca. Nalazi se u sublamina densa i gornjem, papilarnom dermisu. Kodira ga gen COL7A1 koji se sastoji od 118 eksona i veoma malo introna. Na svom amino-terminalnom kraju ima globularnu nekolagenu domenu NC1, a na karboksi-terminalnom kraju manju nekolagenu NC2 domenu. Stvaranje sidrenih vlakanca započinje kada se NC2 krajevi kolagena VII krenu antiparalelno slagati i povezivati disulfidnim vezama. Nakon što se stvore dimeri, dolazi do proteolitičkog odvajanja NC2 domena te nastaju dugačke, nitaste strukture koje na krajevima imaju velike globularne NC1 domene. Novonastali dimeri kolagena tipa VII povezuju se postranično u

snopove koje nazivamo sidrena vlakanca. Globularne domene NC1 na tim snopovima vežu se za laminine i kolagen tipa IV u lamina densa i na kolagen tipa I u dermisu. Na taj način dolazi do povezivanja lamina densa (laminin 332) s elementima sublamina densa i gornjeg papilarnog dermisa. Epidermolysis bullosa hereditaria dystrophica posljedica je defekta kolagena tipa VII (95,103).

1.3. Postojeće spoznaje o primjeni ELISA BP 1 i ELISA BP 2 u bolesnika s BP

Uvođenje ELISA BP 1 i 2 u dijagnostiku BP dovelo je do značajnih promjena jer ova metoda ima veliku osjetljivost i specifičnost. Giudice i suradnici su 1994. godine objavili primjenu ELISA za određivanje autoprotutijela usmjerenih prema transmembranskom proteinu BP 2 u bolesnika s BP koristeći rekombinantni oblik NC16A od 42 aminokiseline, bez N-terminalnih 17 aminokiselina. Tom metodom utvrđena su autoprotutijela u 53% bolesnika s BP (104). Zillikens i suradnici su potom razvili ELISA BP 2 koja je koristila cijelu rekombinantnu NC16A. Tom metodom osjetljivost testa je u bolesnika s BP u njihovom istraživanju iznosila 94% (105). Ide i suradnici su 1995. godine razvili ELISA BP 1 koristeći rekombinantni oblik C terminalne mišje domene BP230. U nešto manje od 50% seruma bolesnika s BP identificirali su autoprotutijela usmjerena prema BPAg1 (17,106).

Usljedilo je niz radova u kojima je pokazano da je NC16A domena BPAg2 imunodominanta u bolesnika s BP, a autoprotutijela usmjerena prema njoj utvrđena su u 75% do 90% bolesnika u različitim studijama (27,70,107,108). Većina bolesnika s BP uz IgG autoprotutijela usmjerena prema BPAg2, razvije IgA i IgE protutijela usmjerena prema BPAg2 (28,109,110). Autoprotutijela usmjerena prema drugom ciljnom antigenu BPAG 1 mogu se utvrditi u 50% do 70% bolesnika (27,71). Kao i u prethodnim istraživanjima, Chan i suradnici demonstrirali su veliku osjetljivost ELISA BP 1 i 2 (96%) u 23 bolesnika s BP(111). S obzirom na dobivene rezultate, autori su predložili da, uz IIF, ELISA BP 1 i 2 budu dijagnostička metoda u bolesnika sa sumnjom na BP (111). Komercijalno su dostupna dva specifična i osjetljiva ELISA BP 1 i 2 testa: jedan tvrtke Euroimmun, Lübeck, Njemačka te drugi tvrtke MBL, Nagoya, Japan.

1.3.1. Dijagnostička vrijednost BP 1 i 2

Prvi su Nakatani i suradnici u studiji provedenoj na 110 bolesnika s BP usporedili rezultate dobivene ELISA testom NC16A domenom BP 2 s titrovima dobivenim IIF, no nije uočena nikakva povezanost. Naime, serumi bolesnika

koji su bili negativni na ELISA NC16A BP 2 u IIF dijelom su bili pozitivni, a dijelom negativni. Nakatani i suradnici su pretpostavili da je tome uzrok što pozitivan IIF predstavlja imunoreaktivnost seruma bolesnika s BP ne samo prema BPAg2 već i prema BPAg1 antigenu (107). Kasnije su Sakuma-Oyama i suradnici u svojoj studiji na 102 seruma bolesnika s BP usporedili vrijednosti ELISA BP 2 s rezultatima IIF. Serumi svih bolesnika uzeti su prije uvođenja sistemske terapije. U radu je utvrđena korelacija između ELISA BP 2 i IIF (Spearman rang korelacija = 0,29, P = 0,004) (70). Rezultati tog istraživanja u potpunosti su u suprotnosti s onima Nakatanija i suradnika. Činjenica je kako su u radu Sakuma-Oyama i suradnika serumi uzeti kod pojave bolesti ili u ranoj fazi, odnosno prije terapije, što navodi na zaključak kako autoprotutijela NC16A sudjeluju u inicijalnoj fazi bolesti. Thoma-Uszynski i suradnici su na serumima uzetim u 127 bolesnika s BP, većinom prije uvođenja imunosupresivne terapije, dokazali visoku dijagnostičku vrijednost ELISA BP 2 i BP 1 (27). Za ELISA BP 2 pokazalo se da korelira s težinom kliničke slike, to jest da je viša kod bolesnika s generaliziranom bolešću u odnosu na one s lokaliziranim oblikom. ELISA BP 1 također se pokazala dijagnostički konkluzivna, doduše manje no ELISA BP 2, odnosno povezana s blažim kliničkim varijantama (lokaliziranim oblicima) BP (27). Uslijedile su studije koje su potvrdile značajnu dijagnostičku vrijednost ELISA BP 1 i 2 u bolesnika s BP (108,109).

1.3.2. Aktivnost bolesti i vrijednosti ELISA BP 1 i 2

U studijama se uz dijagnostičku vrijednost ELISA BP 1 i BP 2 pojavila i teza o mogućem praćenju aktivnosti bolesti u bolesnika s BP, pa su uslijedile studije koje su to pokušale dokazati ili opovrgnuti. Tako su Kobayashi i suradnici na 7 bolesnika s BP pratili vrijednosti ELISA BP 1 i 2 te IIF i utvrdili kako vrijednosti ELISA BP 2 najbolje prate aktivnost bolesti (108). Pri tome je važno naglasiti kako je riječ o jednostavnoj metodi koja je relativno brza (rezultati su gotovi za manje od 4 sata) i praktična je za obradu većeg broj uzoraka, ali i relativno skupa. Njezina uporaba je osobito opravdana u specijaliziranim centrima gdje se bolesnici s BP liječe u većem broju (108). Sitaru i suradnici su u svojoj

studiji na temelju tjednog praćenja vrijednosti ELISA BP 2 na četiri bolesnika, koje su pratili tijekom 66 tjedana, uočili kako autoprotutijela odražavaju aktivnost bolesti u ovih bolesnika (112). I Döpp i suradnici su kod 10 bolesnika s BP pratili vrijednosti ELISA BP 2 i aktivnost bolesti. Serumi su skupljani prije uvođenja terapije te svaka 2 tjedna zaključno s osmim tjednom terapije (110). I oni su kod svojih bolesnika utvrdili da vrijednosti ELISA BP 2 dobro prate aktivnost bolesti. Naime nakon 8 tjedana liječenja i značajnog kliničkog poboljšanja u svih bolesnika, IgG autoprotutijela bila su blizu ili ispod granične vrijednosti ELISA BP 2. Također su usporedili aktivnost bolesti s titrom IIF, no za razliku ELISA BP 2 titar IIF nije pratio aktivnost bolesti (110). Budući da je više studija, koje su uključile bolesnike s BP u ranoj fazi bolesti i prije uvođenja imunosupresivne terapije, uočeno da vrijednosti ELISA BP 2 prate aktivnost bolesti, postavilo se pitanje prate li ju i vrijednosti ELISA BP 1. Yoshida i suradnici su proveli istraživanje na 239 seruma bolesnika s BP. U 54 (84,4%) od 64 seruma BP bolesnika u aktivnoj fazi i 113 (64,6%) od 175 seruma bolesnika u remisiji utvrđena je pozitivna vrijednost ELISA BP 2, dok je u 37 (57,8%) od 64 seruma BP bolesnika u aktivnoj fazi i 136 (77,7%) od 175 seruma bolesnika u remisiji imalo pozitivnu ELISA BP 1. Iz ovih je rezultata vidljivo da ELISA BP 2 u dijelu bolesnika ne odražava aktivnost bolesti. Također su u svojoj studiji utvrdili da ni vrijednosti ELISA BP 1 ne prate aktivnost bolesti u bolesnika s BP (71).

1.3.3. Vrijednosti ELISA BP 1 i 2 i IIF

Schmidt i suradnici su u studiji na 15 bolesnika s BP pratili korelaciju aktivnosti bolesti i vrijednosti ELISA BP 2 i titra IIF. Bolesnici su praćeni svaki tjedan prvih 8 tjedana kada su i uzimani serumi, te potom jedan puta mjesečno sljedećih godinu dana. Devet bolesnika liječeno je prednisolonom i dapsonom, a šest doksiciklinom i niacinamidom. U obje skupine pokazala se korelacija u aktivnosti bolesti s vrijednostima ELISA BP 2, dok ista nije nađena u usporedbi s titrovima IIF (113). U toj studiji posebna pažnja posvećena je i utjecaju terapije. Tako je uočena ranija negativizacija ELISA BP 2 u skupini koja je liječena s prednisolonom u odnosu na skupinu liječenu tetraciklinima.

Ta razlika može se objasniti supresivnim utjecajem kortikosteroida na limfocite i produkciju autoprotutijela, dok je utjecaj doksiciklina snažniji na limfocite što interferira s aktivnošću neutrofila i eozinofila, i time umanjuje upalni odgovor (113). Feng i suradnici su na 42 bolesnika s BP u Kini uspoređivali vrijednosti ELISA BP 2 i IIF. Vrijednosti titra IIF kod bolesnika s BP bile su unutar raspona od 1:10 do 1:160. Samo kod jednog bolesnika s BP vrijednost ELISA BP 2 je bila negativna uz pozitivan titar IIF. Uspoređujući ova dva parametra nije nađena značajna korelacija (Spearmanova rang korelacija = 0,173, $P = 0,273$). Lažno negativan rezultat ELISA BP 2 (OD = 0,09) u jednog od ovih bolesnika autori obrazlažu posljedicom više čimbenika (114). Smatraju da su lezije bile ograničene, a sama bolest vrlo blaga, pa je i serumski nivo protutijela usmjerenog na BPAg2 mogao biti nizak. Osim toga kod bolesnika se možda nisu stvorila autoprotutijela usmjerena prema NC16A epitopu, već usmjerena na druge epitope intracelularne ili ekstracelularne domene pa je nalaz ELISA BP 2 negativan. Rezultat vezivanja autoprotutijela na splitiranoj koži u IIF ne predstavlja samo status autoprotutijela usmjerenih protiv BPAg2 već i protiv BPAg1 kao i drugih autoprotutijela usmjerenih na zonu bazalne membrane. Upravo stoga je specifičnost ELISA BP 2 veća no IIF (114).

U retrospektivnoj studiji na 138 bolesnika s BP, Charneux i suradnici, usporedili su rezultate ELISA BP 1, ELISA BP 2 i IIF s aktivnošću kliničke slike bolesnika tijekom godinu dana. Iz dobivenih rezultata je razvidno kako su vrijednosti ELISA BP 2 snažno povezane s opsežnošću kliničke slike (generaliziranost i veliki broj svježih mjehura i bula) (115). S druge strane kod lokaliziranog oblika BP izraženost vrijednosti ELISA BP 2 je bila manja. U ovom istraživanju nije nađena korelacija između vrijednosti ELISA BP 1 i aktivnosti bolesti. Medijan titra IIF u bolesnika s pozitivnom vrijednosti ELISA BP 1 bio je značajno viši od medijana IIF bolesnika kod kojih je vrijednost ELISA BP 1 bila negativna. U tom istraživanju autori nisu našli dokaze o pozitivnom niti negativnom odnosu između ELISA BP 1 i kliničke slike. Stoga su zaključili da je ELISA BP 1 pouzdana metoda, mada manje osjetljiva od ELISA BP 2 te kako kombinacija ove dvije metode rezultira 91% osjetljivost u dijagnostici BP (115).

Roussel i suradnici su u retrospektivnoj studiji, koja je uključila 190 novo dijagnosticiranih bolesnika s BP, proveli istraživanje o koristi rutinskog određivanja ELISA BP 1 i BP 2 u dijagnostici BP. Istraživanje je provedeno multicentrično u 23 dermatološka centra u Francuskoj. Uočena je umjerena, ali statistički značajna, korelacija između ELISA BP 2 i aktivnosti bolesti (116). Autoprotutijela usmjerena prema BPAg2 bila su manje izražena kod bolesnika s lokaliziranim oblikom bolesti, a nije uočena nikakva statistička razlika između osjetljivosti testova ELISA BP 1 i ELISA BP 2 (116).

Di Zenzo i suradnici su u prospektivnoj multicentričnoj studiji na 49 bolesnika uočili da aktivnost bolesti korelira i s vrijednostima IgG usmjerenih protiv BP 2 NC16A domene, ali i COOH terminalnog epitopa BPAg2. Upravo stoga oni kao i Bernard i suradnici predlažu praćenje vrijednosti ELISA BP 1 i 2 tijekom snižavanja i ukidanja terapije, jer visoke vrijednosti ELISA BP 1 i 2 (tri puta veće od normalnih graničnih vrijednosti) upućuju na rizik za relaps BP unutar sljedeće godine (28,117). U studiji Yanga i suradnika, kod 62 bolesnika s BP u Kini, utvrdili su kako je osjetljivost testa ELISA BP 1 statistički značajno manja od ELISA BP 2. Svi bolesnici uključeni u ovo istraživanje bili su u ranoj fazi bolesti s generaliziranim oblikom (lezije zahvaćaju više od 30% površine tijela) pa je i očekivana povišena razina autoprotutijela usmjerenih prema BPAg2. S druge strane protutijela usmjerena prema BPAg1 uglavnom su povišena u upalnoj fazi i fazi remisije, za razliku od bulozne faza. Stoga je u studiji jasno prikazano kako je razina IgG protutijela usmjerenih na BPAg2 ELISA metodom viša u bolesnika s većom aktivnošću bolesti (118). U retrospektivnoj studiji Lee i suradnika koja je uključila 47 bolesnika s BP, vrijednosti ELISA BP 2 bile su statistički značajno u korelaciji s aktivnošću bolesti ($r = 0,45$, $P = 0,002$). Uz to vrijednosti ELISA BP 2 bile su više u bolesnika s kraćim trajanjem bolesti (manje od tri mjeseca) (119).

Sardi i suradnici su u multicentričnoj retrospektivnoj studiji koja je uključila 313 bolesnika s BP usporedili dijagnostičke metode DIF, IIF i ELISA. DIF se pokazala kao najosjetljivija metoda (90,8%). Slijede je redom IIF koja kao supstrat koristi jednjak kunića (76%), IIF na splitiranoj koži (73,3%), IIF na majmunskom jednjaku (73,2%), ELISA BP 2 (72%) i ELISA BP 1 (59%). Statistički značajna razlika je uočena između osjetljivosti DIF i pojedinih

seroloških metoda ($P = 0,0001$), a osjetljivost svih seroloških metoda zajedno nije se statistički razlikovala od DIF (120). Rezultati korelacijskih studija sugeriraju da titar IIF uglavnom odgovara protutijelima usmjerenim prema BPAg1, dok protutijela utvrđena DIF uglavnom odgovaraju onima usmjerenim prema BPAg2. Autori sugeriraju kako je upravo to razlog zbog čega rezultati svih seroloških metoda povećavaju ukupnu osjetljivost. Stoga je preporuka kod sumnje na BP učiniti DIF te sve serološke testove. Kao iznimka navodi se mogućnost izostavljanja ELISA BP 1 u bolesnika s pozitivnim titrom IIF (120). Novije studije u tijeku uglavnom se temelje na prospektivnim istraživanjima, s dužim razdobljem praćenja i analizom svih dijagnostičkih metoda.

ELISA BP 1 i BP 2 danas se uglavnom koriste u kliničkoj praksi, dok su imunoblot i imunoprecipitacijski testovi, mnogo zahtjevniji za izvođenje i rezervirani su za specifične slučajeve kod negativnih ELISA BP 1 i BP 2 nalaza ili u istraživačke svrhe (28). Čini se da ELISA BP 2 predstavlja dobar način praćenja aktivnosti bolesti u bolesnika s BP (17,28). Stoga se čini da bi ELISA BP 2 mogla poslužiti i u terapijskoj odluci, osobito kod bolesnika koji su bez kožnih lezija a još su na sustavnoj imunopresivnoj terapiji (112). ELISA BP 1 i BP 2 dokazali su nekoliko prednosti nad tradicionalnim dijagnostičkim metodama budući omogućuju testiranje većeg broja uzoraka, brzi su i jednostavni za izvođenje te su bolje standardizirani (28).

2. HIPOTEZA

Očekuje se da će izraženost vrijednosti antigena BP 1 i BP 2 biti povezana s aktivnošću bolesti, spolom i dobi bolesnika s buloznim pemfigoidom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja

S obzirom na različite podatke u dosadašnjoj literaturi, a kako ovaj problem do sada nije istraživan u našoj populaciji, opći cilj istraživanja jest utvrditi jesu li vrijednosti antigena buloznog pemfigoida 1 i 2 povezane s aktivnošću bolesti.

U ovom istraživanju postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

- Utvrditi jesu li vrijednosti antigena buloznog pemfigoida 1 i 2 prediktivni za kliničku remisiju bolesti.
- Utvrditi postoji li razlika u prediktivnoj vrijednosti antigena buloznog pemfigoida 1 i 2 te titra cirkulirajućih protutijela buloznog pemfigoida indirektnom imunofluorescencijom s obzirom na aktivnost bolesti.
- Utvrditi utječe li spol na vrijednosti antigena buloznog pemfigoida 1 i 2 u bolesnika s buloznim pemfigoidom.
- Utvrditi utječe li dob na vrijednosti antigena buloznog pemfigoida 1 i 2 u bolesnika s buloznim pemfigoidom.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

1. Uzorak

U ovo retrospektivno istraživanje uključeno je 30 bolesnika oba spolova koji su u razdoblju od 1.1.2007. do 31.12.2009. liječeni u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Klinici za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uvjeti za uključivanje bolesnika u ispitivanje bili su:

- a) anamnestički podaci o pojavi mjehura na koži,
- b) histološki nalaz subepidermalnog mjehura,
- c) nalaz direktne imunofluorescencije – dokazani depoziti duž epidermodermal-ne granice te
- d) nalaz indirektno imunofluorescencije – dokazana cirkulirajuća protutijela usmjerena protiv epidermodermalne granice.

Istraživanjem je obuhvaćeno 30 bolesnika oba spola u dobi od 30 do 88 godina (prosječna dob = 69,7, SD = 13,82, medijan = 71). Uzorak je obuhvatio 16 (53,3%) žena i 14 (46,7%) muškaraca, među kojima nije bilo statistički značajne dobne razlike ($t = 0,23$, $df = 28$, $P > 0,28$).

2. Procjena aktivnosti bolesti utvrđena je na temelju retrospektivne analize bolesnika uključenih u istraživanje u okviru projekta Autoimune bulozne dermatoze u Republici Hrvatskoj, voditeljice prof. dr. sc. Branke Marinović, financiranog od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (šifra projekta 108-0000000-0105). Iz Protokola za unos podataka dobiveni su podaci o dobi i spolu bolesnika, pratećim bolestima te aktivnosti bolesti tijekom jednogodišnjeg praćenja.

3. U svih bolesnika dijagnoza je postavljena na temelju anamneze i kliničkog pregleda, a potvrđena patohistološkim nalazom te nalazima direktne i indirektno imunofluorescencije. Kriteriji za uključivanje bolesnike s BP bili su: anamnestički podaci o pojavi mjehura na koži, histološki nalaz subepidermalnog mjehura, nalaz DIF – dokazani depoziti duž

epidermodermalne granice, nalaz IIF – dokazana cirkulirajuća protutijela usmjerena protiv epidermodermalne granice. U trenutku uključanja u studiju svim bolesnicima uzeta je krv (5 ml) za indirektnu imunofluorescenciju, BP 1 i BP 2 ELISA metodu, te desmoglein 1 i desmoglein 3 ELISA metodu. Isto je ponovljeno i tijekom redovitih kontrola nakon mjesec dana te tri, šest i dvanaest mjeseci.

4. Bolesnici su svrstani u tri skupine sukladno aktivnosti bolesti. U skupinu „aktivna bolest“ uključeni su bolesnici kod kojih su uočeni svježi mjehuri i bule te erozije i kraste. U skupinu „cijeljenje“ uključeni su bolesnici kod kojih unazad dva tjedna nije bilo svježih mjehura niti bula. U skupinu „remisija“ uključeni su bolesnici bez kožnih promjena.

4.2. Metode

4.2.1. Protokol za unos podataka

Za svakog ispitanika ispunjen je protokol za unos podataka koji je sadržavao podatke o osobnoj anamnezi, inicijalnom dermatološkom statusu te kliničkom nalazu i liječenju tijekom praćenja (nakon mjesec dana, tri mjeseca, šest mjeseci i godinu dana). Primjer protokola za ispitivanje nalazi se u prilogu doktoratu.

4.2.2. Histološka analiza

Svi uzorci kože fiksirani su u 10% formaldehidu, potom uklopljeni u parafin, rezani u rezove debljine 4 μm i obojani hemalaun-eozinom. Nalazi su očitani pod svjetlosnim mikroskopom.

4.2.3. Direktna imunofluorescencija

Uzorci kože smrznuti su na -24°C , potom su učinjeni 6 μm kriostatski rezovi koji su fiksirani na predmetno staklo te osušeni na zraku tijekom 10 minuta. Nakon ispiranja u fosfatom puferiranoj fiziološkoj otopini svaki preparat je prekriven antihumanim imunoglobulinom (IgG, IgA, IgM) te komplementom C3 i fibrinogenom. Protutijela su obilježena fluorescein izocijanatom (sekundarna protutijela Dako, Glostrup, Danska). Nakon inkubacije u vlažnoj komori tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, uslijedila su dva ispiranja, u fosfatom puferiranoj fiziološkoj otopini, po 15 minuta. Preparati su potom fiksirani s kapljicom puferiranog glicerina. Nalazi su nakon toga očitani pod fluorescentnim mikroskopom na 450-490 nm.

4.2.4. Indirektna imunofluorescencija

Uzorci kože, dobiveni od zdravih dobrovoljaca, isprani su u sterilnoj fiziološkoj otopini. Potom su stavljani u 1 mol/L NaCl tijekom 48-72 sata, na temperaturi

od 0-4°C, uz laganu vibraciju. Kada se površina nabrala bio je znak da je došlo do separacije epidermisa i dermisa. Preparat je uklopljen ornitin transkarbamilazom te su učinjeni kriostatski rezovi debljine 4 µm. Serumi bolesnika su razrijeđeni s fosfatom puferiranom fiziološkom otopinom u razrjeđenjima od 1:10 do 1:320. Potom su serumi nakapani na supstrat („splitirana ljudska koža“) nakon čega je uslijedila inkubacija na 37°C tijekom jednog sata. Po završetku inkubacije preparati su temeljito isprani u fosfatom puferiranoj fiziološkoj otopini. Na preparate su aplicirani antihumani imunoglobulini obilježeni fluorescein izocijanatom (sekundarna protutijela Dako, Glostrup, Danska) te je uslijedila ponovna inkubacija na 37°C tijekom jednog sata. U svaku skupinu su bile uključene pozitivne i negativne kontrole. Potom su nalazi očitani pod fluorescentnim mikroskopom.

4.2.5. ELISA BP 1 i BP 2 metoda

Serumi bolesnika su razrijeđeni u omjeru 1:101. Potom su kalibrator i serum bolesnika (100 µL) dodani u jažice obložene s BPAg1 ili BPAg2 i inkubirani na 23°C tijekom 60 minuta radi imobilizacije protutijela. Nakon četiri ispiranja dodalo se u svaku jažicu 100 µL peroksidaze konjugirane s protuhumanim IgG protutijelima te je uslijedila inkubacija konjugata tijekom 60 minuta na 23°C. Nakon ponovljena četiri ispiranja, dodana je peroksidaza te je uslijedila inkubacija supstrata tijekom 30 minuta na 23°C. Potom je u svaku jažicu dodano 100 µL otopine za zaustavljanje enzimske reakcije. Stabilizacija obojenja je postignuta dodavanjem 1 mol/L sumporne kiseline. Apsorpcija jažica se očitavala na valnoj duljini 240 nm pomoću automatskog čitača (Asys Hitech Model Expert Plus). U svaku skupinu su bile uključene pozitivne i negativne kontrole.

4.2.6. Desmoglein 1 i 3 ELISA test

Primijenjen je komercijalni anti Dsg1 ili Dsg3 – ELISA test (MESACUP Desmoglein test; Medical and Biological Laboratories, Nagano, Japan). Prema uputama proizvođača, proveo se s razrijeđenim serumom 1:100. Nakon

imobilizacije protutijela (na 23°C tijekom 60 minuta) i ispiranja, uslijedila je konjugirana inkubacija dodavanjem peroksidaze konjugirane protuhumanim IgG protutijelima (na 23°C tijekom 60 minuta). Nakon obilnog ispiranja i dodavanja tetrametilbenzidin supstrata slijedila je faza inkubacije supstrata (na 23°C tijekom 30 minuta). Po zaustavljanju enzimske reakcije dodavanjem otopine za zaustavljanje enzimske reakcije i stabiliziranja obojenja apsorbancija jažica očitavala se na valnoj duljini 450 nm pomoću automatskog čitača (Asys Hitech Model Expert Plus). Bile su uključene pozitivne i negativne kontrole.

4.2.7. Statistička analiza

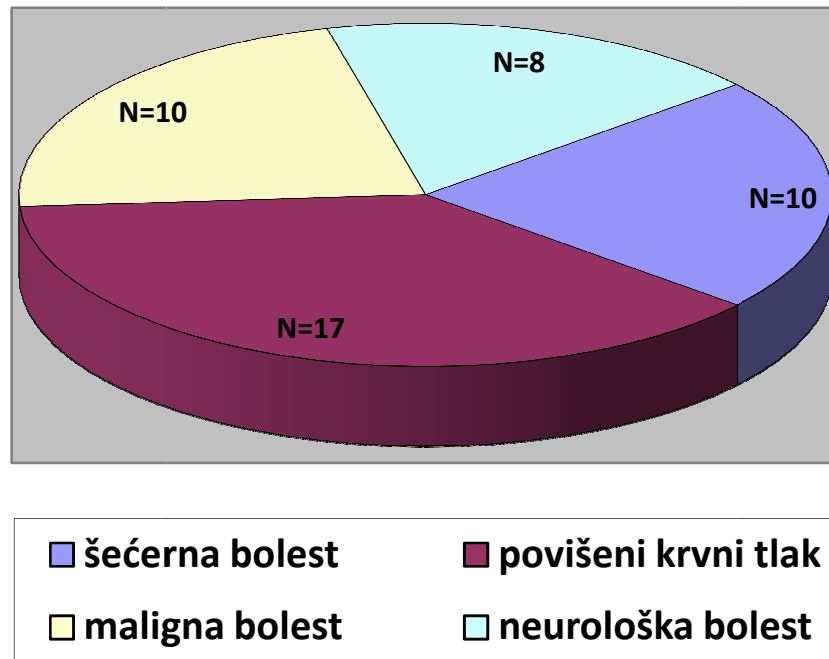
Statistička analiza rezultata uključila je sljedeće testove: (a) Spearmanov koeficijent korelacije za usporedno testiranje veličine povezanosti testova ELISA BP 1, BP 2 i IIF s fazama bolesti, (b) Mann Whitneyev U test kojim je testirana spolna specifičnost vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2, (c) Kruskal Wallisov χ^2 test kojim je ispitivan odnos između dobi (bolesnici su bili podijeljeni u tri dobne skupine) te vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 te (d) složenu analizu varijance za ponovljena mjerenja kojom se provjeravala robusnost neparametrijskih testova. Kako bi omogućili usporedbu veličine povezanosti između vrijednosti tri testa i različitih faza bolesti, računali smo 95% interval pouzdanosti oko koeficijenta korelacije. Preklapanje intervala interpretirano je kao nepostojanje statističke razlike u veličini povezanosti (uz rizik zaključivanja manji od 0,05%). Intervali pouzdanosti dobiveni su tzv. bootstrapping procedurom s 2000 uzoraka (s nadomještanjem sudionika). Svi statistički postupci provedeni su uporabom statističkog programskog paketa SPSS 20.

5. REZULTATI

5.1. Uzorak

Kada je riječ o pratećim bolestima u uzorku je bilo 10 oboljelih od šećerne bolesti (33,3%), 17 s povišenim krvnim tlakom (56,7%), 10 bolesnika s malignom bolešću (33,3%), te 8 s dijagnosticiranim neurološkim i psihičkim poremećajem (26,7%).

Slika 6. Prateće bolesti u uzorku.



5.1.1. Izraženost kliničke slike u bolesnika s BP tijekom godine dana

Kod uključivanja, kao i na kontrolama mjesec dana po uključivanju svi bolesnici bili su u aktivnoj fazi bolesti (Tablica 1). Na kontrolama tri mjeseca po uključivanju još uvijek je 80% bolesnika bilo u aktivnoj fazi bolesti, dok je na kontrolama 12 mjeseci nakon uključivanja u studiju 40% bolesnika bilo u remisiji.

Tablica 1. Raspodjela kliničkog nalaza kod bolesnika s BP prema mjerenjima.

Mjerenja	Aktivna faza N (%)	Faza cijeljenja N (%)	Faza remisije N (%)
Početno mjerenje	30 (100)	0	0
Nakon 1 mjesec	30 (100)	0	0
Nakon 3 mjeseca	24 (80)	5 (16,7)	1 (3,3)
Nakon 6 mjeseci	13 (43,3)	12 (40)	5 (16,7)
Nakon 12 mjeseci	13 (43,3)	5 (16,7)	12 (40)

5.1.2. Vrijednosti IIF, ELISA BP 1 i ELISA BP 2 u inicijalnom mjerenju

U inicijalnom mjerenju, kada su svi bolesnici bili u aktivnoj fazi bolesti, 86,7% bolesnika imalo je pozitivnu vrijednost ELISA BP 2, 60% ih je imalo pozitivnu IIF-u i 36,7% bolesnika imalo je pozitivnu ELISA BP 1 (Tablica 2).

Tablica 2. Pozitivne i negativne vrijednosti IIF, BP 1 i BP 2 u inicijalnom mjerenju.

	IIF	ELISA BP 1	ELISA BP 2
	n (%)	n (%)	n (%)
Negativna vrijednost testa	12 (40,0)	19 (63,3)	4 (13,3)
Pozitivna vrijednost testa	18 (60,0)	11 (36,7)	26 (86,7)

5.1.3. Osjetljivost seroloških metoda u fazi aktivne bolesti

Osjetljivost ELISA BP 2 u bolesnika u aktivnoj fazi bolesti bila je veća od osjetljivosti ELISA BP 1 i IIF (Tablica 3).

Tablica 3. Osjetljivost testova IIF, ELISA BP 1 i ELISA BP 2 u fazi aktivne bolesti u inicijalnoj točki mjerenja.

Osjetljivost testa	
	%
IIF	60
ELISA BP 1	37
ELISA BP 2	87

5.2. Povezanost vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 s različitim fazama bolesti

Kao što pokazuje distribucija kliničkih ishoda prikazana u Tablici 1, varijabilnost kliničkih ishoda u prva tri mjerenja (početnom, nakon prvog mjeseca i nakon 3 mjeseca) bila je nepostojeća ili minimalna. Stoga smo za ispitivanje veze između vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 i različitih faza bolesti (aktivna faza, cijeljenje i remisija) uzeli samo dva posljednja mjerenja – nakon 6 mjeseci i nakon 12 mjeseci.

Prema podacima prikazanim u Tablici 4, vrijednosti ELISA BP 1 bile su statistički značajno povezane s različitim fazama bolesti i nakon 6 i nakon 12 mjeseci praćenja. Vrijednosti ELISA BP 2 nisu bile značajno povezane s različitim fazama bolesti niti u jednoj od dvije točke mjerenja.

Tablica 4. Povezanost između vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 i različitih faza bolesti nakon 6 i 12 mjeseci.

Nakon 6 mjeseci		
	r_s	$p <$
ELISA BP 1	-0,52	0,01
ELISA BP 2	-0,09	0,63
Nakon 12 mjeseci		
ELISA BP 1	-0,37	0,05
ELISA BP 2	-0,12	0,54

5.3. Povezanost vrijednosti IIF s različitim fazama bolesti

Zbog nepostojeće ili marginalne varijabilnosti kliničkog ishoda u prve tri točke mjerenja (usporedi Tablicu 1), za procjenu povezanosti titra IIF i aktivnosti bolesti uzeta su samo dva posljednja mjerenja (nakon 6 i 12 mjeseci).

Prema podacima prikazanim u Tablici 5, titar IIF bio je statistički značajno povezan s različitim fazama bolesti u obje točke mjerenja.

Tablica 5. Povezanost između vrijednosti IIF i različitih faza bolesti nakon 6 i 12 mjeseci.

Mjerenje nakon 6 mjeseci		
	r_s	$p <$
IIF	-0,42	0,05
Mjerenje nakon 12 mjeseci		
IIF	-0,51	0,01

5.4. Usporedba veličine povezanosti između vrijednosti ELISA BP 1 i IIF te različitih faza bolesti

Kako su se i ELISA BP 1 i IIF pokazali značajno povezani s različiti fazama bolesti u mjerenjima nakon 6 i 12 mjeseci, odlučili smo usporediti veličinu povezanosti dva testa s ishodom (aktivnost bolesti) kako bismo ustanovili koji od njih ima veću prediktivnu vrijednost.

Kao što je vidljivo iz preklapanja 95% intervala pouzdanosti oko Spearmanovog koeficijenta korelacije (Tablica 6), oba su testa bila podjednako prediktivna za razlikovanje faza bolesti u dva posljednja mjerenja. Iznimno široki intervali pouzdanosti, koji odražavaju vrlo ograničenu statističku snagu testa, posljedica su malog uzorka.

Tablica 6. Veličina povezanosti vrijednosti BP 1 i IIF s različitim fazama bolesti.

Mjerenje nakon 6 mjeseci		
	r_s	95% interval pouzdanosti
ELISA BP 1	-0,52	-0,75 – -0,23
IIF	-0,42	-0,68 – -0,10
Mjerenje nakon 12 mjeseci		
	r_s	95% interval pouzdanosti
ELISA BP 1	-0,37	-0,64 – -0,04
IIF	-0,51	-0,73 – -0,24

5.5. Usporedba praćenja aktivnosti bolesti testovima ELISA BP 1 i BP 2

Odnos između vrijednosti testova ELISA BP 1 i BP 2 te aktivnosti bolesti ispitali smo i uspoređujući prosječne vrijednosti testova u inicijalnoj i posljednjoj točki mjerenja na dva specifična poduzorka bolesnika. Prvi poduzorak su činili bolesnici koji su nakon 12 mjeseci praćenja bili u remisiji (ukupno 12 bolesnika). U drugom poduzorku bilo je 13 bolesnika koji su i u posljednjem mjerenju bili u aktivnoj fazi bolesti. Tablica 7 prikazuje prosječne vrijednosti testova u dvije točke mjerenja u ta dva poduzorka.

Tablica 7. Prosječne vrijednosti testova ELISA BP 1 i BP 2 u inicijalnoj i posljednjoj točki mjerenja u dva specifična poduzorka bolesnika.

Bolesnici kojih je bolest na kraju praćenja (nakon 12 mjeseci) bila u remisiji (n = 12)

	Inicijalno mjerenje	Nakon 12 mjeseci
	Aritm. sredina (SD)	Aritm. sredina (SD)
ELISA BP 1	1,64 (3,84)	1,79 (4,20)
ELISA BP 2	88,89 (56,96)	18,01 (8,16)

Bolesnici kod kojih je aktivna faza bolesti potrajala do kraja praćenja (n = 13)

	Inicijalno mjerenje	Nakon 12 mjeseci
	Aritm. sredina (SD)	Aritm. sredina (SD)
ELISA BP 1	24,84 (32,45)	30,90 (53,05)
ELISA BP 2	79,95 (67,13)	52,79 (95,27)

U poduzorku bolesnika koji su na kraju praćenja bili u remisiji, prosječna je vrijednost ELISA BP 2 nakon 12 mjeseci bila upadljivo manja od one

zabilježene u inicijalnom mjerenju. Ista tendencija, samo uz bitno manju razliku u vrijednostima testa u inicijalnom i posljednjem mjerenju, zabilježena je i u slučaju bolesnika s BP u aktivnoj fazi tijekom jednogodišnjeg praćenja. Prosječne vrijednosti ELISA BP 1 nisu pratile isti trend, već su u oba poduzorka u inicijalnom mjerenju bile nešto niže nego u završnom mjerenju.

5.6. Utjecaj spola na vrijednosti ELISA BP 1 i ELISA BP 2

Uzorak korišten u ovom istraživanju obuhvatio je 16 žena i 14 muškaraca. Uspoređujući vrijednosti ELISA BP 1 i ELISA BP 2 nakon 6 mjeseci i 12 mjeseci ispitivanja utvrđeno je da spol bolesnika nije statistički značajno povezan s vrijednostima ELISA BP 1 i BP 2 (Tablica 8).

Tablica 8. Spolne razlike u vrijednostima ELISA BP 1 i ELISA BP 2.

Mjerenje nakon 6 mjeseci				
	Spol	Rang prosjeka	Mann-Whitney U test	Vjerojatnost
ELISA BP 1	Žene	15,25	108,0	P > 0,83
	Muškarci	15,79		
ELISA BP 2	Žene	15,28	108,5	P > 0,88
	Muškarci	15,75		
Mjerenje nakon 12 mjeseci				
	Spol	Rang prosjeka	Mann-Whitney U test	Vjerojatnost
ELISA BP 1	Žene	15,69	109,0	P > 0,87
	Muškarci	15,29		
ELISA BP 2	Žene	14,97	103,5	P > 0,72
	Muškarci	16,11		

Rezultati neparametrijskih testova provjereni su složenom analizom varijance za ponovljena mjerenja. Sukladno gornjim rezultatima, spol nije imao statistički

značajni utjecaj na višekratna ($n = 5$) mjerenja ELISA BP 1 ($F_{1, 28} = 0,07$, $P > 0,78$), odnosno BP 2 ($F_{1, 28} = 1,02$, $P > 0,32$).

5.7. Utjecaj dobi na vrijednosti ELISA BP 1 i ELISA BP 2

U istraživanju su, podsjetimo, sudjelovali bolesnici u dobi između 30 i 88 godina. Kako bismo ispitali povezanost između dobi i vrijednosti cirkulirajućih protutijela usmjerenih na antigen BP 1 i BP 2 — ili, preciznije, postojanje statistički značajnih razlika u vrijednostima cirkulirajućih protutijela usmjerenih na antigene BP 1 i BP 2 između različitih dobnih skupina — uzorak je podijeljen u tri podjednako brojne dobne skupine: 1 = 30-65, 2 = 66-75, 3 = 76-88. Kao što prikazuje Tablica 9, statistička analiza nije potvrdila vezu između dobi i vrijednosti cirkulirajućih protutijela usmjerenih protiv antigena buloznog pemfigoida 1 i 2.

Tablica 9. Dobne razlike u vrijednostima ELISA BP 1 i ELISA BP 2.

Mjerenje nakon 6 mjeseci				
	Dobne skupine	Rang prosjeka	Kruskal-Wallisov χ^2 test	Vjerojatnost
ELISA BP 1	1	16,25	0,54	P > 0,76
	2	14,20		
	3	16,05		
ELISA BP 2	1	12,45	2,16	P > 0,33
	2	18,20		
	3	15,85		
Mjerenje nakon 12 mjeseci				
	Dobne skupine	Rang prosjeka	Kruskal-Wallisov χ^2 test	Vjerojatnost
ELISA BP 1	1	17,20	0,97	P > 0,61
	2	14,10		
	3	15,20		
ELISA BP 2	1	14,55	0,90	P > 0,63
	2	17,65		
	3	14,30		

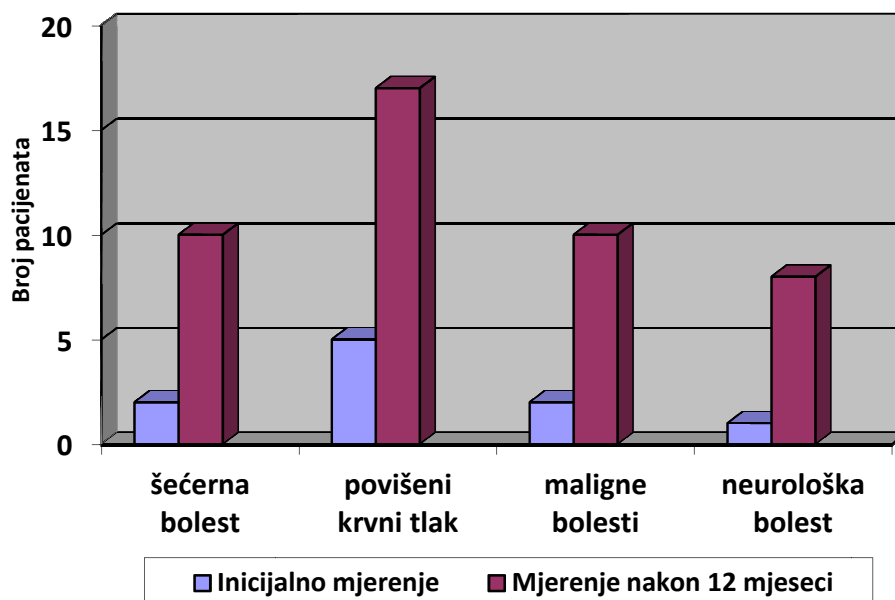
Kao i u slučaju analize utjecaja spola, nalazi neparametrijskih testova provjereni su složenom analizom varijance za ponovljena mjerenja. Prema rezultatima, dob nije imala značajan utjecaj na višekratna mjerenja ELISA BP 1 ($F_{2, 27} = 0,07$, $P > 0,78$), odnosno BP 2 ($F_{2, 27} = 0,82$, $P > 0,45$).

5.8. Prisutnost pratećih bolesti u bolesnika u remisiji nakon 12 mjeseci

Nakon 12 mjeseci praćenja, u remisiji je bilo 12 (40%) bolesnika. Analizom pratećih bolesti, kako je vidljivo iz Slike 2, ustanovljeno je da je u remisiji nakon 12 mjeseci bilo 2 od 10 bolesnika sa šećernom bolesti, 5 od 17 s povišenim vrijednostima tlaka, 2 od 10 oboljelih od malignoma te 1 od 8 s psihičkom i neurološkom bolešću. Valja naglasiti da su neki bolesnici imali više od jedne prateće bolesti.

U usporedbi s bolesnicima bez komorbiditeta, od kojih su gotovo svi (četiri od ukupno pet) nakon 12 mjeseci bili u remisiji, od bolesnika s jednom ili više pratećih bolesti (njih 25) samo je osam (32%) bilo u remisiji u završnoj točki mjerenja.

Slika 7. Prateće bolesti u uzorku bolesnika u remisiji i u aktivnoj fazi bolesti nakon 12 mjeseci.



6. RASPRAVA

Autoimune bulozne dermatoze, a među njima i BP, neprestano su u središtu interesa istraživanja u dermatovenerologiji. BP ima svoje posebno mjesto upravo stoga što je najčešća od ovih rijetkih bolesti i što uglavnom zahvaća stariju populaciju te samim time čini dijagnostički i terapijski postupak puno težim (121). Raznolika klinička prezentacija, osobito u prebuloznom stadiju, u nekim slučajevima zahtijeva i detektivske sposobnosti liječnika kako bi došao do ideje o čemu bi mogla biti riječ te proveo dijagnostičku obradu. Zbog brojnih bolesti od kojih starija populacija današnjeg doba boluje, te brojnih lijekova koje uzima, liječenje ovih bolesnika često predstavlja izazov (17). No i kada se postavi dijagnoza BP i započne liječenje, svjedoci smo različite brzine odgovora na terapiju, kao i različitog tijeka bolesti. Kod nekih bolesnika recidivi se izmjenjuju s kratkotrajnim periodima odsutnosti bolesti dok se kod nekih bolest nikada više ne pojavi. Upravo se stoga stalno istražuju biljezi koji bi mogli korelirati s aktivnošću bolesti i služiti kliničarima kao okvir za provođenje terapije (28).

Kako bismo pridonijeli znanstvenim uvidima o uspješnoj terapiji BP, odlučili smo provesti istraživanje na bolesnicima s BP u našoj populaciji i ispitati prate li vrijednosti ELISA BP 1 i 2 te IIF aktivnost bolesti. Također, željeli smo ispitati osjetljivost tih testova. Nadalje, u studiji smo analizirali i utječu li dob i spol na vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2. Posebno su bilježene prateće bolesti u naših bolesnika s BP te postizanje remisije u ispitivanoj skupini bolesnika.

BP je jedina autoimuna bolest čija pojavnost raste s dobi. Većinom se dijagnosticira u sedmom i osmom desetljeću života (18,19,122). U našem istraživanju prosječna dob bolesnika s BP bila je 69,7 godina (medijan vrijednost = 71). Ta nešto niža prosječna dob mogla bi biti posljedica kraće očekivane životne dobi osoba u Republici Hrvatskoj u odnosu na istraživanja u Francuskoj gdje prosječna dob oboljelih od BP iznosi 80 godina, kao i u Velikoj Britaniji (medijan dobi pojave BP 80 godina, u rasponu od 23-102 godine), dok je u Italiji u istraživanju na sličnom broju bolesnika (N = 32) medijan iznosio 74 godine (14,16,123). Uz to, moguće je da se prebulozna faza BP ne dijagnosticira u starijoj životnoj dobi, već se svrbež kao dominantan simptom - uz pojavu urtika i papula – liječi kortikosteroidima, što

rezultira smanjivanjem simptoma i regresijom promjena, bez dijagnosticiranja bolesti.

Visoka životna dob bolesnika s BP razlogom je i prisutnosti većeg broja pratećih bolesti u tih bolesnika. Tako je hipertenzija bila najčešća prateća bolest u našem uzorku bolesnika s BP. Utvrđena je u njih 17 (56,7%). Šećerna bolest i različite maligne bolesti registrirane su u 10 (33,3%) bolesnika s BP, dok je njih 8 (26,7%) imalo neki neurološki i/ili psihički poremećaj. Navedeni podaci usporedivi su s rezultatima dobivenim u drugim istraživanjima. Tako je u retrospektivnoj studiji među bolesnicima s BP na Tajlandu uočena hipertenzija u više od 40% bolesnika što je nešto više od prosjeka njihove populacije za dob iznad 70 godina starosti (124). U istraživanju Cordela i suradnika među 341 bolesnikom s BP njih 123 (36%) imalo je barem jednu neurološku bolest (125).

U trećine naših bolesnika utvrđena je prisutnost maligne bolesti. Dugo se smatralo kako je maligna bolest provodirajući čimbenik za razvoj BP (17,18). Dvije velike kontrolirane studije koje su uključile više od 1700 bolesnika s BP i kontrolnu skupinu odgovarajuće dobi, provedenu u Japanu i Švedskoj, utvrdile su nisku povezanost BP i malignih bolesti (28,38). Naime, jedino je u istraživanju provedenom na japanskoj populaciji uočena nešto veća povezanost karcinoma želuca s BP (38). Čini se da je često spominjana povezanost malignih bolesti u bolesnika s BP posljedica kontrolnih skupina koje nisu bile dobno usklađene, kao i činjenice da se bolesnici s BP liječe u bolničkim uvjetima gdje se provodi detaljna obrada i češće dijagnosticiranje maligne bolesti (28). U tom kontekstu, zanimljivo je istraživanje Venencia i suradnika koji su utvrdili istu učestalost malignih bolesti u bolesnika s BP kao i u općoj populaciji, ali su upozorili na veći broj malignih bolesti kod bolesnika s BP i negativnom IIF, za razliku od bolesnika s BP i pozitivnom IIF – gdje je broj malignoma bio niži (126).

Nasuprot tome Ogawa i suradnici su u svom istraživanju, uz veću pojavnost karcinoma želuca u bolesnika s BP, uočili da bolesnici s malignitetom imaju negativne ili niske vrijednosti IIF-a (38). U istraživanju Kulthanana i suradnika, niti jedan bolesnik s BP i malignom bolešću nije imao negativan IIF (124).

Među naših deset bolesnika s malignom bolešću, također niti jedan bolesnik nije imao negativan IIF. Kako bi se utvrdio pravi odnos BP i malignih bolesti nužne su daljnje studije koje će usporediti rizik u mlađih bolesnika s BP u odnosu na starije. Nadalje čini se važnim u istraživanjima uzeti u obzir specifične karcinome, poput karcinoma bubrega, larinksa ili leukemije u bolesnika s BP, kako je to učinjeno u japanskoj populacijskoj studiji za karcinom želuca (16). Upravo zbog nepotpuno razjašnjenog odnosa BP i maligne bolesti, iz predostrožnosti se u mlađih bolesnika te onih srednje životne dobi preporuča učiniti obrada kako bi se isključila maligna bolest – osobito u bolesnika s teškom kliničkom slikom i onima refraktornim na terapiju (17).

U studiji Kulthanana i suradnika utvrđena je znatno veća prevalencija šećerne bolesti u bolesnika s BP u usporedbi s općom populacijom Tajlanda (124). Iste rezultate potvrdila su istraživanja Chuanga i suradnika (127). Suprotno tome Taylor i suradnici nisu utvrdili povećanu pojavnost šećerne bolesti u bolesnika s BP u odnosu na kontrolnu skupinu (124,128). Kako bi se utvrdila ili isključila povezanost između ove dvije bolesti nužna su dodatna istraživanja na značajno većem uzorku uz dobno usklađenu kontrolnu skupinu. U našem istraživanju trećina bolesnika s BP imala je šećernu bolest prije početka (bilo kakve) terapije. U odnosu na učestalost šećerne bolesti u populaciji iznad 65 godine u Republici Hrvatskoj, koja iznosi 15 do 20%, dobivene vrijednosti su nešto veće (129). No, obzirom na mali uzorak bolesnika s BP u našoj studiji, ne bi trebalo žuriti sa zaključkom o različitoj raširenosti u odnosu na opću populaciju.

Objavljeno je nekoliko kontroliranih populacijskih studija koje povezuju rizik za razvoj BP s neurološkim bolestima. Ta povezanost detaljnije se istražuje otkako je uočeno da se antigeni BP 1 i BP 2 nalaze i u središnjem živčanom sustavu (53,54). Također je uočeno da stečena ili nasljedna mutacija DST gena u miševa, gena koji kodira različite izoforme BPAg1, dovodi do teške distonije i senzorne živčane degeneracije (130). U više istraživanja uočen je veći rizik za razvoj BP kod bolesnika s multiplom sklerozom, Parkinsonovom bolešću, cerebrovaskularnim inzultom, demencijom, ali i psihijatrijskim poremećajima kao što su unipolarna i bipolarna psihoza (47,49,131). U više

od četvrtine bolesnika uključenih u ovu studiju utvrđena je neka neurološka ili psihijatrijska dijagnoza koja je bila prisutna prije pojave BP. Prema dosadašnjim istraživanjima čini se da bi neurološke bolesti mogle biti predisponirajući faktor za BP stvaranjem humoralnog odgovora u središnjem živčanom sustavu, koji zatim širenjem zahvaća i kožu (tzv. „širenje epitopa“) (28). S obzirom na niz nepoznanica, nužna su daljnja istraživanja usmjerena pojašnjavanju veze između ovih poremećaja.

Nakon što je uočeno kako bolesnici s BP imaju često povišene vrijednosti cirkulirajućih IgG protutijela usmjerenih prema BPAg1 i BPAg2, uz već postojeće serološke, histološke i imunohistokemijske analize pojavili su se antigen specifični, serološki testovi u dijagnostici BP. Pojavom komercijalno dostupnih testova, ELISA BP 1 i BP 2 ušle su u kliničku praksu dijagnostike BP. ELISA BP 2 usmjerena je na detekciju cirkulirajućih IgG koji reagiraju s najčešćom antigenom domenom BP 180 NC16A u bolesnika s BP, dok je ELISA BP 1 usmjerena na detekciju cirkulirajućih protutijela usmjerenih na C-terminalnu domenu BP 230. U studijama je utvrđena osjetljivost ELISA BP 2 od 72% do 90%, a specifičnost od 90% do 99% (112,116,119,120). Sardi i suradnici su u svom retrospektivnom istraživanju na 313 bolesnika s BP utvrdili veliku osjetljivost na račun niže specifičnosti ELISA BP 2 testa (osjetljivost od 72% uz specifičnost od 94%), dok je ELISA BP 1 pokazala visoku specifičnost (od 99,1%) uz relativno nisku osjetljivost (od 59%) (120). Sitaru i suradnici su utvrdili osjetljivost ELISA BP 2 među svojim bolesnicima s BP od 89% (112). U radu Lee i suradnika, osjetljivost ELISA BP 1 bila je 72,3%, a ELISA BP 2 čak 97,9% (119). Charneux i suradnici su u svom istraživanju koje je uključilo 138 bolesnika s BP utvrdili osjetljivost ELISA BP 1 od 59%, osjetljivost ELISA BP 2 od 86%, dok je osjetljivost IIF na ljudskoj splitiranoj koži bila 62% (115). Stoga autori u dijagnostici BP podupiru važnost kombiniranja seroloških metoda uz histološku i imunohistokemijsku analizu.

U retrospektivnom, multicentričnom istraživanju, koje je uključilo 190 bolesnika s novo dijagnosticiranim BP iz 23 dermatološka centra u Francuskoj, Roussel i suradnici su utvrdili osjetljivost od 79% za ELISA BP 2, 61% za ELISA BP 1 te 81% osjetljivost za IIF na splitiranoj ljudskoj koži (116). Yoshida i suradnici su na uzorku od 239 bolesnika ustanovili osjetljivost ELISA BP 1 od 72,4%, dok

je osjetljivost ELISA BP 2 bila 69,9%. Važno je napomenuti da je u njihovom uzorku samo 64 bolesnika bilo u akutnoj fazi bolesti, dok su svi ostali bili u remisiji (71). U istraživanju Damoiseaux i suradnika utvrđena je osjetljivost ELISA BP 1 od 58,3%, dok je osjetljivost ELISA BP 2 iznosila 80% (132). U nedavnoj metaanalizi provedenoj na 17 publikacija koje su zadovoljile uključne kriterije za istraživanje vrijednosti ELISA BP 2 u dijagnostici BP (ukupan uzorak su činila 583 bolesnika), dobivena je osjetljivost ELISA BP 2 od 95% (133). Rezultati metaanalize upućuju na zaključak kako je ELISA BP 2 visoko osjetljiva za BP, pa je preporuka da se redovito koristi u laboratorijskoj dijagnostici buloznih dermatoza (133).

U našem longitudinalnom retrospektivnom istraživanju svi bolesnici su u inicijalnom mjerenju bili u aktivnoj fazi bolesti. Od njih je 86,7% imalo pozitivnu vrijednost ELISA BP 2, 60% ih je imalo pozitivan rezultat u IIF, dok je 36,7% bolesnika imalo pozitivan rezultat ELISA BP 1. S obzirom na dobivene rezultate, naše istraživanje potvrđuje nalaze prethodnih studija o visokoj osjetljivosti ELISA BP 2 za BP.

Nalaze o različitoj osjetljivosti testova uglavnom potvrđuju i analize povezanosti između vrijednosti testova i razvoja bolesti. Primjerice, Roussel i suradnici su u retrospektivnoj studiji ustanovili značajne korelacije između vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 te broja novih bula (dnevno), što je bio indikator aktivnosti bolesti. No, dok je korelacija između vrijednosti ELISA BP 1 i broja novih bula bila mala ($r_s = 0,16$), povezanost je između vrijednosti ELISA BP 2 i tako mjerene aktivnosti bolesti bila umjerene veličine ($r_s = 0,44$) (116). Autori su također primijetili da je ELISA BP 2 bila češće pozitivna u serumima bolesnika s težom kliničkom slikom, za razliku od onih s lokaliziranim oblikom BP. Za razliku od toga, ELISA BP 1 bila je podjednako pozitivna kod bolesnika s lokaliziranim i generaliziranim oblikom BP. Taj je nalaz u suprotnosti s prethodno objavljenim radovima u kojima je prisutnost autoprotutijela usmjerenih na BP antigen 1 bila značajno veća u slučajevima lokaliziranog oblika BP (112,116,120). U jednom drugom retrospektivnom istraživanju, korelacija između vrijednosti ELISA BP 1 i broja svježih mjehura na dnevnoj razini graničila je sa statističkom značajnošću ($P = 0,51$) za razliku od

korelacije između ELISA BP 2 i broja svježih mjehura koja je bila visoko značajna ($P < 0,001$) (115).

Cilj našeg istraživanja bio je i utvrditi postoji li povezanost vrijednosti ELISA BP 1 i ELISA BP 2 i titra IIF s fazama aktivnosti bolesti (aktivna faza, faza cijeljenja i remisija) u našem uzorku. U početnom mjerenju, pri uključivanju u studiju, te u drugom (nakon mjesec dana) i trećem mjerenju (nakon tri mjeseca) svi su ili gotovo su svi bolesnici (treće mjerenje) bili u aktivnoj fazi bolesti. Stoga smo za ispitivanje povezanosti između vrijednosti ELISA BP 1, BP 2 i titra IIF te aktivnosti bolesti odlučili uzeti isključivo dva posljednja mjerenja (šest i 12 mjeseci nakon inicijalnog mjerenja) u kojima je postojala dovoljna varijabilnost različitih faza bolesti. Prema dobivenim rezultatima, vrijednosti ELISA BP 1 te IIF bile su statistički značajno povezane s aktivnošću bolesti. Niti u jednom od dva mjerenja vrijednosti ELISA BP 2 nisu bile značajno povezane s fazama bolesti. Ovdje valja napomenuti kako je u posljednjem mjerenju 12 od ukupno 30 bolesnika bilo u remisiji. Naš nalaz proturječi rezultatu koji su Sitaru i suradnici objavili u radu iz 2007. godine, gdje su analizirajući tijek bolesti u četiri bolesnika naveli da vrijednosti ELISA BP 2 dobro korespondiraju s aktivnošću BP (112). Navedene razlike možda se mogu objasniti razlikom u veličini uzorka.

U sljedećem smo koraku proveli usporednu analizu veličine povezanosti aktivnosti bolesti i vrijednosti ELISA BP 1 i IIF. Rezultati su ukazali na podjednaku prediktivnost ELISA BP 1 i IIF, što je moguće povezati s činjenicom da fluorescencija u IIF većinom predstavlja autoprotutijela usmjerena prema antigenu BP 1 (165,120).

Gornji nalaz nije u skladu s rezultatima istraživanja Yoshida i suradnika, prema kojima vrijednosti ELISA BP 1 nisu indikativne za razlikovanje faza bolesti kada je riječ o BP. Autori su, naime, ustanovili kako je 54 (84,4%) od 64 seruma bolesnika u aktivnoj fazi i 113 (64,6%) od 175 seruma bolesnika u fazi remisije imalo pozitivne vrijednosti ELISA BP 2, za razliku od pozitivnih vrijednosti ELISA BP 1 koji su nađeni u 37 (57,8%) od 64 seruma bolesnika u aktivnoj fazi te 136 (77,7%) od 175 seruma bolesnika u remisiji (71). Za razliku od tih nalaza, u našim su mjerenjima nakon šest i 12 mjeseci prosječne

vrijednosti ELISA BP 2 među bolesnicima u remisiji bile veće od onih zabilježenih među bolesnicima u aktivnoj fazi bolesti.

Razlika naših nalaza i nalaza Yoshida i suradnika mogla bi biti posljedica činjenice da su naši bolesnici ušli u remisiju nedugo prije kraja kliničkog praćenja (najduže oko četiri mjeseca). Za bolesnike iz ispitivanja Yoshida i suradnika takav podatak ne postoji pa je moguće da su ti bolesnici proveli duži vremenski period u remisiji od naših. U tom slučaju, dužina vremena provedenog u remisiji mogla je utjecati na rezultate usporednog testiranja, imamo li u vidu da ELISA BP 1 i BP 2 detektiraju različita protutijela.

Leuci i suradnici učinili su meta analizu vrijednosti seroloških analiza i kliničke remisije BP. Uključili su devet istraživanja, s ukupno 143 bolesnika s BP, koji su svi u različitom periodu postigli remisiju BP. Od 143 ispitanika samo je u njih 71 (49,6%) učinjena ELISA BP 2. Njih 65 (91,5%) imalo je pozitivne vrijednosti ELISA BP 2 prije početka terapije, dok je na kraju njih 48 (67,6%) i dalje imalo pozitivne vrijednosti ELISA BP 2 iako ih je 40 bilo u potpunoj remisiji, a osmero u fazi cijeljenja. Preostalih 23 (32,2%) bolesnika imalo je negativne vrijednosti ELISA BP 2 i bilo bez znakova aktivne bolesti. Stoga autori smatraju da klinička remisija bolesnika s BP nije praćena serološkom remisijom (134).

Suprotno tome, Sami i suradnici u svom su istraživanju na 10 bolesnika s generaliziranim BP, prije uvođenja terapije, u njih devet utvrdili visoke vrijednosti autoprotutijela usmjerenih prema BPAg1 i BPAg2, a u jednog samo prema BPAg2. Uvedena je intravenska terapija imunoglobulinima te je postupno sniženje vrijednosti autoprotutijela uočeno nakon tri mjeseca terapije. U trenutku serološke remisije svih 10 bolesnika je bilo i u kliničkoj remisiji (135). Navedeno ide u prilog potrebi nastavka istraživanja valjanosti ELISA BP 1 i 2 u praćenju aktivnosti bolesti.

U skupini bolesnika kod kojih je nakon 12 mjeseci praćenja došlo do remisije bolesti, prosječna vrijednost ELISA BP 2 bila je četiri puta manja nego u inicijalnom mjerenju. Sličan nalaz dobiven je u istraživanju Leeja i suradnika (119). Usprkos tome što se ELISA BP 1 pokazala boljom u raspoznavanju različitih faza bolesti nakon šest i 12 mjeseci, ELISA BP 2 se pokazala boljom

u praćenju bolesnika koji su bili u remisiji. I naši rezultati sugeriraju da bi za potrebe redovitog praćenja aktivnosti BP ELISA BP 2 mogla biti metoda izbora. Nažalost veličina našeg uzorka, ograničeni period praćenja i dinamika ulaska u remisiju nisu omogućili detaljnije usporedne analize valjanosti testova u praćenju aktivnosti bolesti.

Dva posljednja cilja studije bila su utvrditi utječu li spol i dob na vrijednosti antigena buloznog pemfigoida 1 i 2 u bolesnika s BP. Prema nama dostupnoj literaturi, mogući se utjecaj tih obilježja na vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 do sada nije ispitivao. Wieland i suradnici ispitivali su rasprostranjenost autoprotutijela usmjerenih prema BPAg1 i BPAg2 u zdravih ispitanika. U studiju je uključeno po 40 ispitanika za svaku dekadu od 20 do 89 godina života (20 žena i 20 muškaraca) te 57 (33 žene i 24 muškarca) u dobi od 90 do 99 godina. Među tih 337 ispitanika samo je njih 25 (7,4%) imalo pozitivnu ELISA BP 1 i/ili ELISA BP 2, dok su svi imali negativan IIF. Vrijednosti autoprotutijela usmjerenih na BPAg1 i BPAg2 nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na dob i spol. Autori smatraju da drugi čimbenici mogu utjecati na razvoj tih autoprotutijela u osoba koje ne boluju od BP, poput okolišnih čimbenika, pratećih bolesti, utjecaja lijekova i radioterapije, ali i ograničenja samih testova (lažno pozitivne vrijednosti). Sugeriraju daljnja istraživanja kako bi se uočili dodatni čimbenici rizika u osoba s predispozicijom za razvoj BP (136).

Kako je BP jedna od rijetkih autoimunih bolesti gdje je broj muškaraca relativno velik u odnosu na žene (u ostalih autoimunih bolesti broj žena višestruko premašuje broj muškaraca), smatrali smo važnim razmotriti pitanje spolne specifičnosti rezultata testova. Valja istaknuti kako je raširenost bolesti nešto veća u žena, ali je učestalost pojavljivanja BP u starijoj životnoj dobi, iznad 80 godina, veća u muškaraca (132). S obzirom da je BP jedna od autoimunih bolesti, od kojih primarno obolijevaju žene, posljednji je nalaz neočekivan.

U ovom istraživanju uzorak je obuhvatio 16 žena i 14 muškaraca, koji su, nakon šest i 12 mjeseci u podjednakoj mjeri bili zastupljeni u različitim fazama bolesti (aktivna faza, faza cijeljenja i faza remisije). Prema provedenim

analizama, spol bolesnika nije imao utjecaj na rezultate ELISA BP 1 i BP 2 prikupljene u pet točaka mjerenja.

Premda je BP bolest starije životne dobi, sporadično se pojavljuje i u djece te u bolesnika mlađe životne dobi. Kako je raspon dobi u našem uzorku bio prilično velik (30 do 88 godina), zanimalo nas je utječe li dob na vrijednosti antigena BP 1 i 2. Kako bismo ispitali povezanost između dobi i vrijednosti cirkulirajućih protutijela usmjerenih na antigen BP 1 i BP 2 uzorak smo podijelili u tri podjednako brojne dobne skupine. Provedene analize nisu ukazale na statistički značajne razlike među skupinama u prosječnim vrijednostima cirkulirajućih protutijela usmjerenih protiv antigena BP 1 i BP 2.

U istraživanju smo također provjerili koliko je bolesnika s jednom ili više pratećih bolesti (25 od 30 bolesnika u našem uzorku) postiglo remisiju osnovne bolesti. Nakon 12 mjeseci praćenja, ukupno je 40% bolesnika ušlo u remisiju. No, od 10 bolesnika sa šećernom bolesti kao pratećom bolesti, samo dva su ušla u remisiju. Slično smo ustanovili i kod drugih pratećih bolesti. Naime, od 17 bolesnika s povišenim krvnim tlakom samo njih pet je bilo u remisiji nakon 12 mjeseci, od 10 bolesnika s malignom bolešću dva su postigla remisiju, a od osam bolesnika s psihičkom i neurološkom bolesti samo je jedan postigao remisiju. Valja napomenuti da su neki bolesnici imali veći broj pratećih bolesti. Na važnost nalaza ukazuje činjenica kako je većina bolesnika bez morbiditeta nakon 12 mjeseci bila u remisiji. Buduća bi istraživanja trebala posvetiti pozornost usporedbi tijeka bolesti u bolesnika sa i bez pratećih bolesti, po mogućnosti kontrolirajući sociodemografska obilježja (spol i dob) bolesnika.

Iako prisutnost autoimunih i malignih bolesti nije identificirana kao provocirajući faktor za pojavu BP, njihova prisutnost povezana je s težom kliničkom slikom, kao i rezistencijom na terapiju (28,38,124). Za razliku od njih, neurološke i psihijatrijske bolesti identificirane su kao mogući provocirajući čimbenik te interferiraju s tijekom bolesti i liječenjem BP (53,54,125).

Naposljetku, potrebno je osvrnuti se na ograničenja provedene studije. Nezaobilazno ograničenje ove longitudinalne studije jest mali uzorak. Veličina uzorka vezana je uz malu pojavnost ove autoimune bolesti. Ipak, imajući u

vidu da se velika većina bolesnika s BP u Hrvatskoj liječi u našoj Klinici, uzorak najvjerojatnije dobro reprezentira populaciju oboljelih od BP. Veći uzorak bi podrazumijevao multicentričnu studiju koja bi zahtijevala dugo razdoblje prikupljanja podataka. Sljedeće ograničenje iskazuje se u činjenici da su u studiju uključeni kako bolesnici s novootkrivenom bolešću tako i oni na imunosupresivnoj terapiji (kod kojih je bolest ranije dijagnosticirana). U budućim bi studijama te dvije podskupine bolesnika trebalo razlikovati zbog moguće specifičnosti rezultata seroloških testiranja. Također, pod uvjetom da je u studiju uključen veći broj bolesnika, u aktivnoj fazi bolesti valjalo bi razlikovati one s generaliziranim od onih s lokaliziranim oblikom bolesti, što bi omogućilo precizniju analizu povezanosti testova s fazama bolesti. Retrospektivni karakter istraživanja imao je za posljedicu ograničeno razdoblje praćenja (12 mjeseci). Duže praćenje, što bi svakako trebalo uzeti u obzir u budućim studijama, omogućilo bi analizu mogućih relapsa ili recidiva, odnosno usporedbu vrijednosti testova u tim situacijama.

Cilj ove studije, provedene retrospektivno na svim bolesnicima liječenim od BP u Klinici za dermatovenerologiju KBC Zagreb od početka 2007. do kraja 2009. godine, bio je istražiti odnos između aktivnosti bolesti i vrijednosti ELISA BP 1, BP 2 te IIF.

Provedene su analize ukazale na statistički značajnu povezanost između vrijednosti ELISA BP 1 i IIF te različitih faza BP, pri čemu nije ustanovljena značajna razlika u prediktivnosti dvaju testova.

U usporedbi s ELISA BP 1, ELISA BP 2 pokazao se superiornim u praćenju aktivnosti bolesti.

Učinak spola na praćenje aktivnosti bolesti testovima ELISA BP 1 i BP 2 nije ukazao na spolno specifične vrijednosti.

Utjecaj dobi na vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2 u pet mjerenja nije dokazao statistički značajne razlike među dobnim skupinama u vrijednostima testova.

Naša studija potvrdila je visoku osjetljivost ELISA BP 2 u dijagnosticiranju BP te korisnost ELISA BP 1 i IIF testova za razlikovanje različitih faza bolesti.

U budućim će se istraživanjima provjeriti naši rezultati i provesti detaljnija analiza prediktivnosti testova za različite faze bolesti.

U hrvatskom kontekstu, buduće bi studije svakako trebale biti multicentrične, s dužim razdobljem uključivanja sudionika te dužim praćenjem aktivnosti bolesti u prikupljenom uzorku.

Čini se da bi ELISA BP 2 mogla biti metoda izbora u praćenju aktivnosti bolesti u bolesnika s BP.

Kada je riječ o dijagnostičkoj vrijednosti razmatranih testova, i u našem istraživanju ELISA BP 2 je pokazala najveću osjetljivost.

Kod bolesnika s negativnim ELISA BP 2 vrijednostima potrebno je učiniti i ostale serološke testove (ELISA BP 1 i IIF).

Bulozni pemfigoid (BP) je subepidermalna bulozna dermatoza koja se najčešće pojavljuje u bolesnika starije životne dobi. Cilj istraživanja bio je istražiti prate li serumske vrijednosti autoprotutijela usmjerenih prema antigenu BP 1 i BP 2, dobivene enzim-vezanim imunosorbentnim testom (ELISA) BP 1 i BP 2 i titrom indirektna imunofluorescencije (IIF), aktivnost bolesti u bolesnika s BP. Uz to željelo se utvrditi utječu li dob i spol na vrijednosti ELISA BP 1 i BP 2. Istraživanje je uključilo sve bolesnike liječene od BP u Klinici za dermatovenerologiju KBC Zagreb od 1. siječnja 2007. do 31. prosinca 2009. godine. Dijagnoza BP je postavljena na temelju kliničke slike, histopatološke i imunohistokemijske analize. Uzorci seruma uzeti su inicijalno te na kontrolama nakon mjesec dana, tri, šest i 12 mjeseci (kao i u slučaju egzacerbacije). U istraživanje je bilo uključeno 30 bolesnika oba spola, starosti 30 do 88 godina. Na svim uzorcima seruma provedena je IIF na ljudskoj splitiranoj koži i ELISA BP 1 i BP 2. Prema nalazima, ELISA BP 2 imala je najveću osjetljivost te je dobro pratila aktivnost bolesti. U završnim mjerenjima, vrijednosti ELISA BP 1 i IIF značajno su razlikovali bolesnike u različitim fazama bolesti, što nije bio slučaj s ELISA BP 2. Spol i dob se nisu pokazali povezanima s vrijednostima testova.

Rezultati ovog istraživanja mogli bi imati kliničke implikacije u smislu primjene ELISA BP 2 u praćenju aktivnosti bolesti u oboljelih na imunosupresivnoj terapiji, a bez kožnih promjena. Premda je ELISA BP 2 i u našem istraživanju iskazala najveću osjetljivost, za bolesnike s negativnim vrijednostima ELISA BP 2 nužno je učiniti i ostale serološke testove (ELISA BP 1 i IIF). Stoga će kombinacija histološke metode, DIF, IIF te ELISA BP 1 i BP 2 za veliku većinu bolesnika s BP rezultirati postavljanjem dijagnoze.

9. SUMMARY

Determination of Antigen Bullous Pemphigoid 1 and 2 Values for Assessment of Disease Activity

Daška Štulhofer Buzina, 2015

Bullous pemphigoid (BP) is a subepidermal blistering disease, primarily affecting the elderly. This study aimed to assess the relationship between BP disease activity and serum levels of autoantibodies directed against BP antigen 1 and BP antigen 2 – detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) BP 1 and BP 2 – and the titer of indirect immunofluorescence (IIF). Additionally, we analyzed whether age and gender moderated ELISA BP 1 and BP 2 disease monitoring. This retrospective study sampled all patients (N = 30) treated for BP at the Department of Dermatology and Venereology, Clinical Hospital Center Zagreb, from 1 January 2007 to 31 December 2009. The diagnosis of BP was based on clinical, histological, and immunohistochemical criteria. Serum samples were collected initially and after one, three, six, and twelve months, as well as in the case of exacerbation. The patients' age ranged from 30-88 years. Serum samples were analyzed by IIF on human salt-split skin and ELISA BP 1 and BP 2. Of the three tests, ELISA BP 2 demonstrated the highest sensitivity. In comparison to ELISA BP 1, ELISA BP 2 was superior in the assessment of disease activity. No significant effects of sex and age were observed.

10. LITERATURA

1. Bruckner-Tuderman L. Blistering diseases. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, ur. Braun-Falco's Dermatology 3. izd. Berlin: Springer; 2009, str. 625-7.
2. Marinović B. Stečene vezikulozne i pustulozne dermatoze. U: Basta-Juzbašić A i sur, ur. Dermatovenerologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 229-52.
3. Lipozenčić J, Marinović B. Bullous skin diseases. Clin Dermatol 2011;29:353-4.
4. Lipsker D, Borradori L. Bullous pemphigoid: What are you? Urgent need of definitions and diagnostic criteria. Dermatology 2010;221:131-134.
5. Zillikens D. Autoimmune bullous diseases. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, ur. Braun-Falco's Dermatology 3. izd. Berlin: Springer; 2009, str. 641-68.
6. Štulhofer Buzina D, Marinović B. From pemphix to desmogleins. Clin Dermatol 2011;29:355-9.
7. König S. A letter of Dr. Sigismund König, Physician of Bern in Switzerland, to the Royal Society. Phil Trans 1681;16:94-103.
8. Holubar K. Remembering Heinrich Auspitz. Am J Dermatopath 1986;8:83-5.
9. Grando SA, Grando AA, Glukhenky BT, Doguzov V, Nguyen VT, Holubar K. History and clinical significance of mechanical symptoms in blistering dermatoses: a reappraisal. J Am Acad Dermatol 2003;48:86-92.
10. Holubar K. Pemphigus: a disease of man and animal. Int J Dermatol 1988;27:516-20.
11. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. JAMA 1967;200:751-8.

12. Mutasim DF, Takahashi Y, Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Diaz LA. A pool of bullous pemphigoid antigen(s) is intracellular and associated with the basal cell cytoskeleton-hemidesmosome complex. *J Invest Dermatol* 1985;84:47-53.
13. Zillikens D, Wever S, Roth A, Weidenthaler-Barth B, Hashimoto T, Bröcker EB. Incidence on autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany. *Arch Dermatol* 1995;131:957-8.
14. Bernard P, Vaillant J, Labeille B, i sur. Incidence and distribution of subepidermal bullous skin diseases in three french regions. *Arch Dermatol* 1995;131:48-52.
15. Rzany B, Weller N. Epidemiology of autoimmune skin disorders. U: Hertl M, ur. *Autoimmune diseases of the skin: pathogenesis, diagnosis, management* 2. izd. Wien, New York: Springer; 2009, str. 25-44.
16. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris-incidence and mortality in UK: population based cohort study. *Brit Med J* 2008;337:a180.
17. Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin* 2011;29:427-38.
18. Marazza G, Pham HC, Schärer L, i sur. Autoimmune bullous disease Swiss study group. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol* 2009;161:861-8.
19. Bertram F, Brocker EB, Zilikens D, Schmidt E. Prospective analysis Francinia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7:424-7.
20. Waisbourd-Zinman O, Ben-Amitai D, Cohen AD, i sur. Bullous pemphigoid in infancy: Clinical and epidemiologic characteristics. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:41-8.
21. Oyama N, Setterfield JF, Powell AM, i sur. Bullous pemphigoid antigen II (BP 180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in

- mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. *Br J Dermatol* 2006;154:90-8.
22. Okazaki A, Miyagawa S, Yamashina Y, Kitamura W, Shirai T. Polymorphisms of HLA-DR and –DQ gene in Japanese patients with bullous pemphigoid. *J Dermatol* 2000;27:149-56.
 23. Nelson KC, Zhao M, Schroeder PR i sur. Role of different pathways of the complement cascade in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 2006;116:2892-900.
 24. Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M i sur. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *J Invest Dermatol* 2004;122:103-10.
 25. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet* 2013;381:320-32.
 26. Skaria M, Jaunin F, Hunziker T i sur. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230. *J Invest Dermatol* 2000;114:998-1004.
 27. Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S i sur. BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2004;122:1413-22.
 28. Di Zenzo G, della Torre R, Zambruno G, Borradori L. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. *Clin Dermatol* 2012;30:3-16.
 29. Laffitte E, Borradori L. Bullous pemphigoid: clinical features, diagnostic markers, and immunopathogenic mechanisms. U: Hertl M, ur. *Autoimmune diseases of the skin: pathogenesis, diagnosis, management* 2nd Ed. Wien, New York: Springer; 2009, str. 71-93.
 30. 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;176:2015-23.

31. Bernard P, Borradori L. Pemphigoid group. U: Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer JV, ur. *Dermatology* 3. izd. China: Elsevier Saunders; 2012,475-90.
32. Liu Z, Shapiro SD, Zhou X i sur. A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 2000;105:113-23.
33. Iwata Y, Komura K, Koderu M i sur. Correlation of IgE autoantibody to BP 180 with a severe form of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2008;144:41-8.
34. Umekoji A, Tsuruta D, Inoue T, Nishimori T, Ishii M. Bullous pemphigoid as a dermatome associated with spindle cell carcinoma of the gallbladder. *J Dermatol* 2010;37:251-4.
35. Venning VA, Wojnarowska F. The association of bullous pemphigoid and malignant disease: a case control study. *Br J Dermatol* 1990;123:439-45.
36. Lindelöf B, Islam N, Eklund G, Arfors L. Pemphigoid and cancer. *Arch Dermatol* 1990;126:66-8.
37. Bourdon-Lanoy E, Roujeau JC, Joly P i sur. Bullous pemphigoid in young patients: a retrospective study of 74 cases. *Ann Dermatol Vener* 2005;132:115-22.
38. Ogawa H, Sakuma M, Marioka S i sur. The incidence of internal malignancies in pemphigus and bullous pemphigoid in Japan. *J Dermatol Sci* 1995;9:136-41.
39. Yanagi T, Kato N, Yamane N, Osawa R. Bullous pemphigoid associated with dermatomyositis and colon carcinoma. *Clin Exp Dermatol* 2007;32:291-4.
40. Pašić A, Ljubojević S, Lipozencić J, Marinović B, Lončarić D. Coexistence of psoriasis vulgaris, bullous pemphigoid and vitiligo: a case report. *J Eur Acad Dermatol* 2002;16:426-7.
41. Ljubojević S, Lipozenčić J. Autoimmune bullous diseases associations. *Clin Dermatol* 2012;30:17-33.

42. Arregui MA, Soloeta R, González R, García I, Trébol I, Tamayo C. Bullous pemphigoid related to PUVA therapy: two further cases. *Actas Dermosifiliogr* 2006;97:444-7.
43. Washio H, Hara H, Suzuki H, Yoshida M, Hashimoto T. Bullous pemphigoid on psoriasis lesions after UVA radiation. *Acta Derm-Venereol* 2005;85:561-3.
44. Wilczek A, Sticherling M. Concomitant psoriasis and bullous pemphigoid: coincidence or pathogenic relationship? *Int J Dermatol* 2006;45:1353-7.
45. Chen YJ, Wu CY, Lin MW i sur. Comorbidity profiles among patients with bullous pemphigoid: a nationwide population-based study. *Br J Dermatol* 2011;165:593-9.
46. Hönigsmann H, Fitzpatrick TB, Path MA, Wolff K. Oral photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): principles and practice. U Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, ur. *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill; 1993, str. 1728-54.
47. Jedlickova H, Hlubinka M, Pavlik T, Semradova V, Budinska E, Vlasin Z. Bullous pemphigoid and internal diseases - A case-control study. *Eur J Dermatol* 2010;20:96-101.
48. Sami N, Bhol KC, Beutner EH, Plunkett RW, Leiferman KM, Ahmed AR. Diagnostic features of pemphigus vulgaris in patients with bullous pemphigoid. Molecular analysis of autoantibody profile. *Dermatology* 2002;204:108-17.
49. Langan SM, Groves RW, West J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol* 2011;131:631-6.
50. Stinco G, Codutti R, Scarbolo M, Valent F, Patrone P. A retrospective epidemiological study on the association of bullous pemphigoid and neurological diseases. *Acta Derm-Venereol* 2005;85:136-9.

51. Chosidow O, Doppler V, Bensimon G i sur. Bullous pemphigoid and amyotrophic lateral sclerosis: a new clue for understanding the bullous disease? *Arch Dermatol* 2000;136:521-4.
52. Langer-Gould A, Albers KB, Van Den Eeden SK, Nelson LM. Autoimmune diseases prior to the diagnosis of multiple sclerosis: a population-based case-control study. *Mult Scler J* 2010;16:855-61.
53. Leung CL, Zheng M, Prater SM, Liem RK. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 2001;154:691-7.
54. Chen J, Li L, Chen J i sur. Sera of elderly bullous pemphigoid patients with associated neurological diseases recognize bullous pemphigoid antigens in the human brain. *Gerontology* 2011;57:211-6.
55. Stanley JR. Bullous pemphigoid. U: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffel DJ, ur. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. New York: McGraw Hill; 2008, str. 475-80.
56. Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P i sur. French Study Group for Bullous Diseases. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol* 2011;131:637-43.
57. Baz K, Ikizoglu G, Kaya TI, Koca A. Furosemide-induced bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol* 2002;16:81-2.
58. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L i sur. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol* 2008;128:415-26.
59. Schmidt E, Benoit S, Bröcker EB. Bullous pemphigoid with localized umbilical involvement. *Acta Derm-Venereol* 2009;89:419-20.
60. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi A, Fujiwara S. A vesicular bullous pemphigoid with an autoantibody against plectin. *Br J Dermatol* 2000;142:813-5.

61. Schmidt E, Sitaru C, Schubert B i sur. Subacute prurigo variant of bullous pemphigoid: autoantibodies show the same specificity compared with classic bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:133-6.
62. Baykal C, Okan G, Sarica R. Childhood bullous pemphigoid developed after the first vaccination. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:348-50.
63. Cordel N, Courville P, Martel P, Musette P, Joly P. Extensive erosive bullous pemphigoid: an atypical and serious clinical variant. *Br J Dermatol* 2002;146:537-9.
64. Geiss Steiner J, Trüeb RM, Kerl K, Mühleisen B, French LE, Hofbauer GF. Ecthyma-gangrenosum-like bullous pemphigoid. *Dermatology* 2010;221:142-8.
65. Schmidt E, Zillikens. D Diagnosis and clinical severity markers of bullous pemphigoid. *F1000 Med Rep* 2009;1:1-5.
66. Joly P, Courville P, Lok C i sur. French Bullous Study Group. Clinical criteria for the diagnosis of bullous pemphigoid: a reevaluation according to immunoblot analysis of patient sera. *Dermatology* 2004;208:16-20.
67. Hong W, Brandling-Bennett HA, Harrist TJ. Noninfectious vesiculobullous and vesiculopustular disease. U: Elder D, Elenitsas R, Jawoosky C, Johnson B, ur. *Lever's histopathology of the skin*. 10. izd. Philadelphia: Lippincott-Raven;2010, str. 246-67.
68. Radoš J. Autoimmune blistering diseases: histologic meaning. *Clin Dermatol* 2011;29:377-88.
69. Lakoš Jukić I, Marinović B. Significance of immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. *Clin Dermatol* 2011;29:389-97.
70. Sakuma-Oyama Y, Powell AM, Oyama N, Albert S, Bhogal BS, Black MM. Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2004;151:126-31.

71. Yoshida M, Hamada T, Amagai M i sur. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2006;41:21-30.
72. Gupta R, Woodley DT, Chen M. Epidermolysis bullosa acquisita. *Clin Dermatol* 2012;30:60-9.
73. Hashmi S, Marinkovich MP. Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Dermatol* 2011;29:398-411.
74. Chan LS. Ocular and oral mucous membrane pemphigoid (cicatricial pemphigoid). *Clin Dermatol* 2012;30:34-7.
75. Joly P, Roujeau JC, Benichou J i sur. Bullous Diseases French Study Group. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *New Engl J Med* 2002;346:321-7.
76. Joly P, Roujeau JC, Benichou J i sur. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol* 2009;129:1681-7.9.
77. Morel P, Guillaume JC. Treatment of bullous pemphigoid with prednisolone only: 0.75 mg/kg/day versus 1.25 mg/kg/day. A multicenter randomized study. *Ann Dermatol Vener* 1984;111:925-8.
78. Dreno B, Sassolas B, Lacour Pi sur. Methylprednisolone versus prednisolone methylsulfobenzoate in pemphigoid: a comparative multicenter study. *Ann Dermatol Vener* 1993;120:518-21.
79. Meurer M. Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases. *Clin Dermatol* 2012;30:78-83.
80. Culton DA, Diaz LA. Treatment of subepidermal immunobullous diseases. *Clin Dermatol* 2012;30:95-102.
81. Schiavo AL, Puca RV, Ruocco V, Ruocco E. Adjuvant drugs in autoimmune bullous diseases, efficacy versus safety: Facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010;28:337-43.

82. Kasperkiewicz M, Schmidt E, Zillikens D. Current therapy of the pemphigus group. *Clin Dermatol* 2012;30:84-94.
83. Beissert S, Werfel T, Frieling U i sur. A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2007;143:1536-42.
84. Kjellman P, Eriksson H, Berg P. A retrospective analysis of patients with bullous pemphigoid treated with methotrexate. *Arch Dermatol* 2008;144:612-6.
85. Lourari S, Herve C, Doffoel-Hantz V i sur. Bullous and mucous membrane pemphigoid show a mixed response to rituximab: experience in seven patients. *J Eur Acad Dermatol* 2011;25:1238-40.
86. Cortés B, Khelifa E, Clivaz L i sur. Mortality rate in bullous pemphigoid: a retrospective monocentric cohort study. *Dermatology* 2012;225:320-5.
87. Rzany B, Partscht K, Jung M i sur. Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Arch Dermatol* 2002;138:903-8.
88. Parker SR, MacKelfresh J., Smeeth L i sur. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *Brit Med J* 2008;337:a180.
89. Roujeau JC, Lok C, Bastuji-Garin S, Mhalla S, Enginger V, Bernard P. High risk of death in elderly patients with extensive bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1998;134:465-9.
90. Parker SR, Dyson S, Brisman S i sur. Mortality of bullous pemphigoid: an evaluation of 223 patients and comparison with the mortality in the general population in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:582-8.
91. Colbert RL, Allen DM, Eastwood D, Fairley JA. Mortality rate of bullous pemphigoid in a US medical center. *J Invest Dermatol* 2004;122:1091-5.

92. Marinkovich MP, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE. The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol* 1992;119:695-703.
93. Chan LS. Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci* 1997;2:343-52.
94. de Pereda JM, Ortega E, Alonso-García N, Gómez-Hernández M, Sonnenberg A. Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* 2009;3:361-4.
95. Yancey KB. The biology of the basement membrane zone. U: Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer JV, ur. *Dermatology* 3rd Ed. China: Elsevier Saunders; 2012, str. 449-59.
96. Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than a simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 1999;112:411-8.
97. Favre B, Fontao L, Koster J i sur. The hemidesmosomal protein bullous pemphigoid antigen 1 and the integrin beta 4 subunit bind to ERBIN. Molecular cloning of multiple alternative splice variants of ERBIN and analysis of their tissue expression. *J Biol Chem* 2001;276:32427-36.
98. Franzke CW, Has C, Schulte C i sur. C-terminal truncation impairs glycosylation of transmembrane collagen XVII and leads to intracellular accumulation. *J Biol Chem* 2006;281:30260-8.
99. Jonkman MF, de Jong MC, Heeres K i sur. 180-kD bullous pemphigoid antigen (BP180) is deficient in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* 1995;95:1345-52.
100. Schumann H, Baetge J, Tasanen K i sur. The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol* 2000;156:685-95.

101. Geuijen CA, Sonnenberg A. Dynamics of the alpha6beta4 integrin in keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2002;13:3845-58.
102. Varki R, Sadowski S, Pfendner E, Uitto J. Epidermolysis bullosa. I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants. *J Med Genet* 2006;43:641-52.
103. Chung HJ, Uitto J. Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 2010;28:93-105.
104. Giudice GJ, Wilske KC, Anhalt GJ i sur. Development of an ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *J Invest Dermatol* 1994;102:878-81.
105. Zillikens D, Mascaro JM, Rose PA i sur. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997;109:679-83.
106. Ide A, Hashimoto T, Amagai M, Tanaka M, Nishikawa T. Detection of autoantibodies against bullous pemphigoid and pemphigus antigens by an enzyme-linked immunosorbent assay using the bacterial recombinant proteins. *Exp Dermatol* 1995;4:112-6.
107. Nakatani C, Muramatsu T, Shirai T. Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins. *Brit J Dermatol* 1998;139:365-70.
108. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K i sur. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2002;30:224-32.
109. Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M i sur. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun* 2000;15:293-300.

110. 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;42:577-83.
111. Chan YC, Sun YJ, Ng PP, Tan SH. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol* 2003;28:651-6.
112. Sitaru C, Dähnrich C, Probst C i sur. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Clin Exp Dermatol* 2007;16:770-7.
113. Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2000;136:174-178.
114. Feng S, Lin L, Jin P i sur. Role of BP 180NC16a-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of bullous pemphigoid in China. *Int J Dermatol* 2008;47:24-8.
115. Charneux J, Lorin J, Vitry F i sur. Usefulness of BP230 and BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assays in the initial diagnosis of bullous pemphigoid: a retrospective study of 138 patients. *Arch Dermatol* 2011;147:286-91.
116. Roussel A, Benichou J, Arivelo Randriamanantany Z i sur. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2011;147:293-8.
117. Bernard P, Reguiai Z, Tancrède-Bohin E i sur. Risk factors for relapse in patients with bullous pemphigoid in clinical remission: a multicenter, prospective, cohort study. *Arch Dermatol* 2009;145:537-42.

118. Yang B, Wang C, Chen S i sur. Evaluation of the combination of BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay and BP230 enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Indian J Dermatol Ve* 2012;78:722-7.
119. Lee EH, Kim YH, Kim S, Kim SE, Kim SC. Usefulness of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinant BP180 and BP230 for Serodiagnosis and Monitoring Disease Activity of Bullous Pemphigoid. *Ann Dermatol* 2012;24:45-55.
120. 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;69:748-53.
121. Daniel BS, Borradori L, Hall RP 3rd, Murrell DF. Evidence-based management of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin* 2011;29:613-20.
122. Joly P, Benichou J, Lok C i sur. Prediction of survival for patients with bullous pemphigoid: a prospective study. *Arch Dermatol* 2005;141:691-8.
123. Cozzani E, Parodi A, Rebora A i sur. Gruppo Ligure di Studi in Dermatologia (GLISID). Bullous pemphigoid in Liguria: a 2-year survey. *J Eur Acad Dermatol* 2001;15:317-9.
124. Kulthanan K, Chularojanamontri L, Tuchinda P, Sirikudta W, Pinkaew S. Prevalence and clinical features of Thai patients with bullous pemphigoid. *Asian Pac J Allergy* 2011;29:66-72.
125. Cordel N, Chosidow O, Hellot MF i sur. French Study Group of Bullous Diseases. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. *Dermatology* 2007;215:187-91.
126. Venencie PY, Rogers RS 3rd, Schroeter AL. Bullous pemphigoid and malignancy: relationship to indirect immunofluorescent findings. *Acta-Derm Venereol* 1984;64:316-9.

127. Chuang TY, Korkij W, Soltani K, Clayman J, Cook J. Increased frequency of diabetes mellitus in patients with bullous pemphigoid: a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 1984;11:1099-102.
128. Taylor G, Venning V, Wojnarowska F, Welch K. Bullous pemphigoid and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:181-4.
129. Poljičanin T, Metelko Ž. Epidemiologija šećerne bolesti u Hrvatskoj i svijetu. *Medix* 2009;80:82-8.
130. Guo L, Degenstein L, Dowling J i sur. Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* 1995;81:233-43.
131. Taghipour K, Chi CC, Vincent A, Groves RW, Venning V, Wojnarowska F. The association of bullous pemphigoid with cerebrovascular disease and dementia: a case-control study. *Arch Dermatol* 2010;146:1251-4.
132. Damoiseaux J, van Rijsingen M, Warnemünde N, Dährnich C, Fechner K, Tervaert JW. Autoantibody detection in bullous pemphigoid: clinical evaluation of the EUROPLUS™ Dermatology Mosaic. *J Immunol Methods* 2012;382:76-80.
133. Tampoia M, Giavarina D, Di Giorgio C, Bizzaro N. Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to detect anti-skin autoantibodies in autoimmune blistering skin diseases: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2012;12:121-6.
134. Leuci S, Gürcan HM, Ahmed AR. Serological studies in bullous pemphigoid: a literature review of antibody titers at presentation and in clinical remission. *Acta Derm Venereol* 2010;90:115-21.
135. Sami N, Ali S, Bhol KC, Ahmed AR. Influence of intravenous immunoglobulin therapy on autoantibody titres to BP Ag1 and BP Ag2 in patients with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol* 2003;17:641-5.

136. Wieland CN, Comfere NI, Gibson LE, Weaver AL, Krause PK, Murray JA. Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in a sample of unaffected subjects. Arch Dermatol 2010;146:21-5.

11. BIOGRAFIJA

Rođena sam 13. svibnja 1970. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 1994. godine. Pripravnički staž obavila sam u Kliničkoj bolnici "Merkur". Godine 1997., započela sam specijalizaciju na Klinici za kožne i spolne bolesti Medicinskog fakulteta u Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski studij iz dermatovenerologije završila sam dvije godine kasnije. Specijalistički ispit iz dermatovenerologije položila sam 2001. godine. U siječnju 2009. položila sam specijalistički ispit iz uže specijalizacije Dermatološke onkologije. Iste godine obranila sam znanstveni magistarski rad na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod naslovom „Cijeljenje varikoznog vrijeda primjenom hipoalergenih polupropusnih prekrivača". Godine 2012. priznat mi je naziv primarius aktom Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske. Stručno sam se usavršavala i u Klinikama za dermatovenerologiju u Republici Njemačkoj, Velikoj Britaniji, Italiji i Češkoj. Sudjelujem kao suradnica u dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi, uključujući i studij na engleskom jeziku, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno sam sudjelovala u radu brojnih stručnih tečajeva, znanstvenih simpozija i kongresa u Hrvatskoj i inozemstvu. Autorica sam poglavlja u pet udžbenika iz dermatovenerologije te po jednog udžbenika iz internističke onkologije i kirurgije. Objavila sam šest znanstvenih radova u CC časopisima te više od 20 znanstvenih radova u SCI i ostalim indeksiranim časopisima.