

Diagnostika a terapie autoimunitních puchýřnatých chorob

MUDr. Miloslav Salavec, CSc.

Klinika nemocí kožních a pohlavních, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Článek shrnuje diagnostické metody a terapeutické přístupy u autoimunitních puchýřnatých dermatóz.

Klíčová slova: kožní autoimunitní puchýřnaté dermatózy, diagnostika, terapie, přehled.

Diagnosis and therapy of autoimmune blistering skin disorders

Diagnostical methods and therapeutical options of skin autoimmune blistering disorders are reviewed.

Key words: skin autoimmune blistering skin disorders, diagnostical methods, therapeutical options, review.

Dermatol. praxi 2010; 4(3): 148–155

Autoimunitní puchýřnaté dermatózy jsou závažná onemocnění postihující kůži a slizniční membrány. Před obdobím účinné kortikoidní systémové terapie vykazovala řada těchto jednotek velmi nepříznivou prognózu. Zavedení účinné terapie moderními preparáty zcela jistě pozitivně snížilo úmrtnost některých klinických jednotek, zejména onemocnění skupiny pemfigu, nicméně i přes zřejmý pokrok v terapii je nutný komplexní přístup k pacientům a pečlivý monitoring možných vedlejších účinků zavedené terapie. Do léčebných, ale i diagnostických metod stále dále pronikají nejnovější poznatky, které ale neovlivní etiologický faktor autoimunitního procesu.

A) Diagnostika

Diagnostické postupy jsou shrnuty v obrazku 1 (dle 7).

Anamnéza

Anamnéza zahrnuje posouzení věku v době prvních projevů, velikosti, četnosti i lokalizace puchýřů i eventuální zjištění provokačních faktorů při vzniku puchýřů (trauma u epidermolysis bullosa acquisita – EBA, expozice UV u některých jednotek onemocnění skupiny pemfigu, dieta, infekce, tumory v anamnéze u paraneoplastických puchýřnatých autoimunitních dermatóz).

Předchozí diagnostické a terapeutické pokusy a stanovení subjektivních obtíží (bolestivost, pruritus až pálení) jsou důležitými údaji při stanovení suspektní diagnózy. Analýza systémového vlivu onemocnění obnáší i zjištění alterací růstu/vývoje, postižení sliznic všech typů lokalizací (dutina ústní, nosohltan, spojivky, genitoanální sliznice, sliznice trávicího traktu – zejména jícen a respirační trakt).

I aspekty rodinné anamnézy (diferenciálně diagnosticky řada kongenitálních epidermolýz) nebo hodnocení geograficko-etnických prvků nemusí být zcela pomíjivé (Fogo selvagem – Jižní Amerika). Konečně nelze zapomenout ani na lékovou anamnézu u tzv. léky indukovaného pemfigu – jde zejména o léky obsahující tiolovou nebo sulfurovou skupinu (captopril, pyrazolony, D-penicilamin, piroxicam apod.).

Klinické vyšetření (celkové fyzikální vyšetření a lokální kožně-slizniční nález)

Fyzikální vyšetření má být zcela úplné a vyčerpávající s důrazem na inspekci celého integumenta včetně sliznic. V lokálním nálezu hodnotíme velikost, lokalizaci a charakter puchýřů i erodovaných změn a podle vzhledu základních morf, tj. puchýřů, se snažíme o zařazení do určité kategorie (napjaté puchýře se známkami zánětlivého postižení spodiny a okolí u onemocnění skupiny pemfigoidu proti plihým puchýřům na normální kůži u typického pemphigus vulgaris – obrázek 1).

I erodované léze pokrývající se krustami a šupinami (pemphigus foliaceus) a dokonce vegetující eflorescence (pemphigus vegetans) mohou značit povrchový typ akantolytického procesu.

Je známo, že puchýře v oblasti lamina lucida zóny bazální membrány (BMZ) jsou větší, napjaté a hojí se bez vzniku jizvení (někdy atrofie), zatímco puchýře v oblasti sublamina densa BMZ se obvykle hojí jizvením a mohou být provázeny tvorbou milíí. Puchýř jako základní klinickou formu onemocnění nemusí vykazovat některé typy pemfigu (zmíněný pemphigus vegetans), akantolytický proces je však prokazován (obrázek 2).

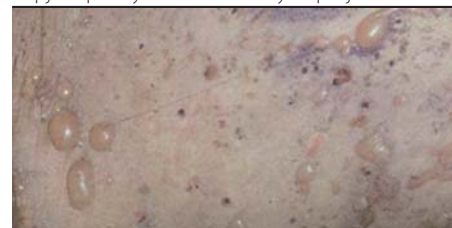
Při fyzikálním vyšetření se zaměříme i na kůži adnexa a na zuby. Klinické obrazy autoimunitních puchýřnatých dermatóz jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. U herpetiformní dermatitidy bývá v typickém případě klasický výsev herpetiformních puchýřů v predilekcích (obrázek 3), nicméně obraz je polymorfní s možností vývoje řady jiných eflorescencí včetně urtikariálních plak.

Dermatopatologie

Při odběru kožní tkáně k vyšetření se snažíme o vyšetření čerstvých puchýřů pro potřeby „klasického“ histopatologického vyšetření s následnou fixací v roztoku formalínu.

U imunofluorescenčních vyšetření (rozvedeno dále) pak je zapotřebí co nejrychlejší

Obrázek 1. Klinický obraz pemphigus vulgaris, napjaté puchýře bez zánětlivých projevů



Obrázek 2. Klinický vzhled lezí pemphigus vegetans



Tabulka 1. Klinicko-patologické aspekty autoimunitních puchýřnatých dermatóz – část 1

	Pemphigus vulgaris	Bulózní pemfigoid	Dermatitis herpetiformis
Postižení pohlaví	Bez rozdílu	Častěji ženy	Mírně častěji muži
Věk	30–60 let	Nad 60 let věku	20–50 let
Kožní projevy	Plíhové puchýře na normální kůži, eroze	Polymorfní obraz, napjaté puchýře na erytematózní kůži, eroze	Puchýřky ve skupinkách na erytematózní a urtikariální kůži, eroze a krusty
Postižení sliznic	Velmi často	Zřídka	Prakticky nikdy
Tzanck – test	Pozitivní	Negativní	Negativní
Nikolski I	Pozitivní	Negativní nebo výjimečně	Negativní
Nikolski II	Pozitivní	Pozitivní	Negativní
Provokace jódem	Negativní	Negativní	Pozitivní
Subjektivní obtíže	Bolestivé eroze	Bolestivé eroze	Pálení, svědění

Tabulka 2. Klinicko-patologické aspekty autoimunitních puchýřnatých dermatóz – část 2

	Slizniční pemfigoidy	Epidermolysis bullosa acquisita	Labd – heterogenní skupina
Postižení pohlaví	Bez rozdílu	Bez rozdílu	Bez rozdílu
Věk	Starší jedinci, průměrně 62–66 let	40–60 let věku nejčastěji	20–50 let
Kožní projevy	Postižení sliznic, (gingiva a konjunktiva) výsledkem jizvení, cca u 1/3 postižení kůže	Spontánní i traumatem indukované puchýře, zejm. nad extenzory a na akrech, hojení atrofiemi, jizvením a tvorbou milíí	Puchýřky na erytematózní i normální (šňůra perel) kůži v oblasti periorální, perianální, na končetinách
Postižení sliznic	Viz výše	Může být (nosohltan, dutina ústní, spojivka)	Možné – rezistentní na terapii
Komplikace	Postižení jícnu, laryngu a závažné postižení očí	Jizvící alopecie, dystrofie neht. plotének	Často indukce léky – zejm. vankomycinem
Jiné	Bolestivé eroze	Existuje i zánětl. forma lezí, Někdy i kritéria pro LE	2 formy: a) forma dospělých, b) děti: chronická bulózní IgA dermatóza dětí

transport vzorku do příslušné laboratoře a „zmražení“ nativní tkáně (možnost transportu vzorků, např. v Michelově médiu a v dalších transportních médiích, není i přes riziko snížené senzitivity testu v České republice bohužel rozšířena).

Histopatologické hodnocení slouží především k lokalizaci autoprotilátkami indukované vzniklé dutiny puchýře. Pro onemocnění skupiny pemfigu je typická ztráta keratinocytární adheze intraepidermálně (adheze cell-to-cell) – proces označovaný jako akantolýza. U **pemphigus vulgaris** dochází ke vzniku dutiny puchýře suprabazálně (obrázek 4), zatímco u **pemphigus foliaceus** je akantolytický proces vyjádřen více povrchověji, subkorneálně (v oblasti stratum spinosum a granulozum). U **paraneoplastického pemfigu** jsou charakteristické změny „interface-dermatitis“ s nekrózami keratinocytů a s mírnou akantolýzou.

U **bulózního pemfigoidu** nacházíme v oblasti dermo-epidermální junkce (DEJ) subepidermální štěpení s eozinofilními granulocyty. U **IgA lineární bulózní dermatózy** je popisován

zánětlivý infiltrát s převahou neutrofilních granulocytů a vakuolární změny. Histopatologické nálezy obou jednotek ale nelze s jistotou odlišit.

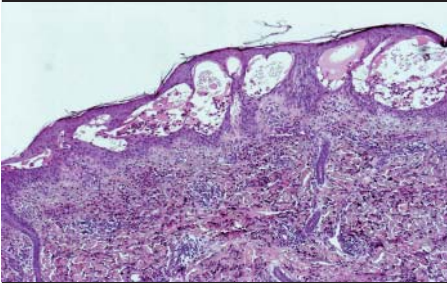
Separace v oblasti DEJ se smíšeným infiltrátem z mononukleárů a neutrofilních granulocytů je zjišťována u **epidermolysis bullosa acquisita** (EBA).

Histologické vyšetření časných lezí **dermatitis herpetiformis** (DH) vykazuje nález neutrofilních mikroabscesů v papilách koria. Dochází k separaci vrcholů dermálních papil od epidermis za tvorby subepidermálně lokalizovaných puchýřků (obrázek 5). Perivaskulární infiltrát je složen z lymfocytů, neutrofilů a eozinofilů. V oblasti dermo-epidermální junkce se prokazují IgA depozita a zvýšené počty aktivovaných T lymfocytů. Přítomnost těchto lymfocytů není projevem odpovědi na gluten, mohou být přímo aktivovány určitým antigenem kožních struktur. Aktivované eozinofily a další zánětlivé buňky se objevují jako odpověď na cytokiny, produkované T lymfocyty. Keratinocyty a další buňky uvolní proteolytické enzymy, což vyústí v poškození zóny bazální membrány.

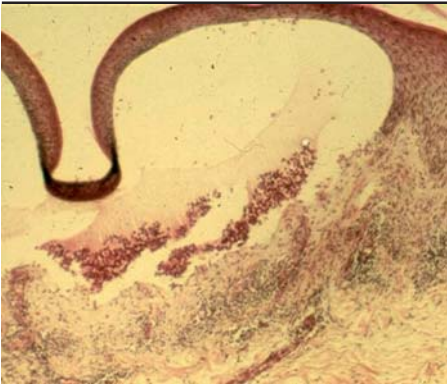
Obrázek 3. Eroze po stržení krytky puchýřků u dermatitis herpetiformis v predilekci pletence ramenního a nad extenzory končetin



Obrázek 4. Intraepidermální dutina puchýře u pemphigus vulgaris, foto zapůjčeno laskavostí doc. MUDr. P. Cetkovské, Ph.D., Kožní klinika FN Plzeň



Obrázek 5. Histopatologický obraz subepidermálního puchýře u dermatitis herpetiformis



Obrázek 6. Přímá imunofluorescence u pemphigus vulgaris, lineární depozita IgG v intercelulární substanci epidermis

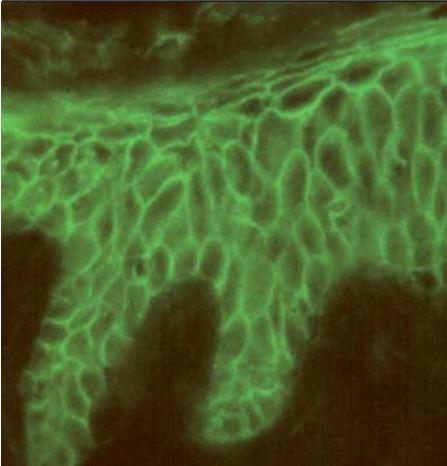
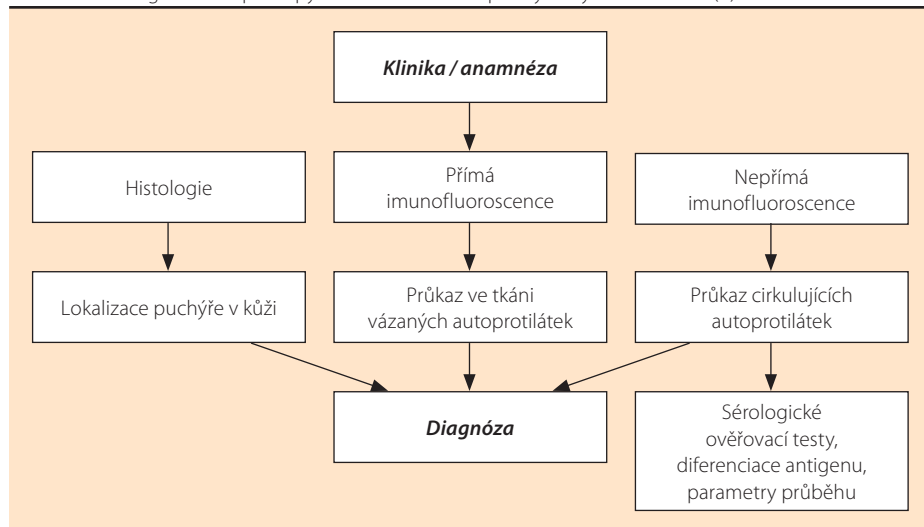
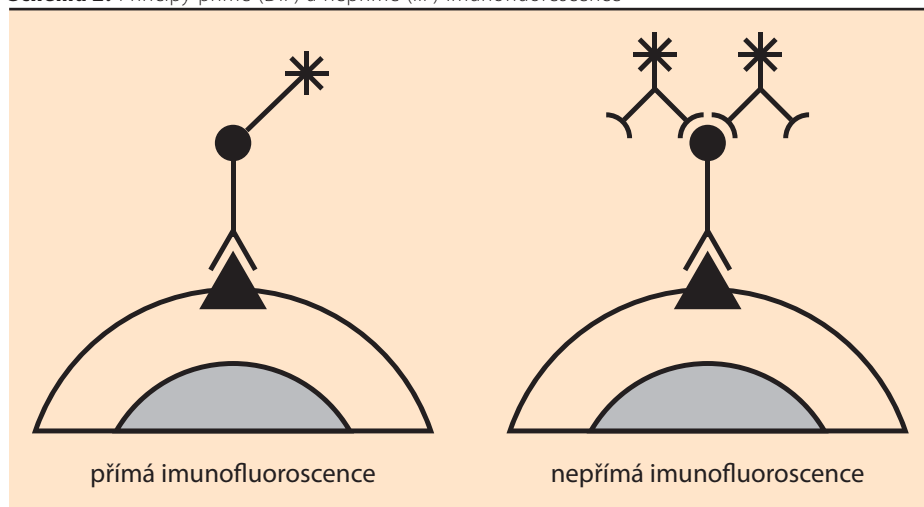


Schéma 1. Diagnostické postupy u autoimunitních puchýřnatých dermatóz (7)**Schéma 2.** Principy přímé (DIF) a nepřímé (IIF) imunofluorescence

Imunofluorescenční vyšetření

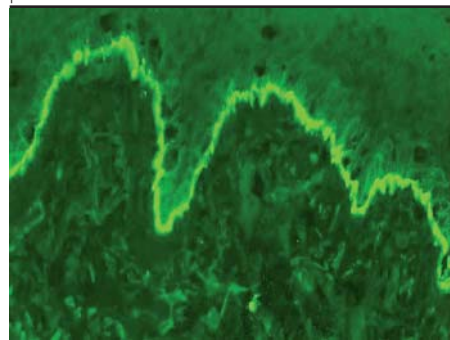
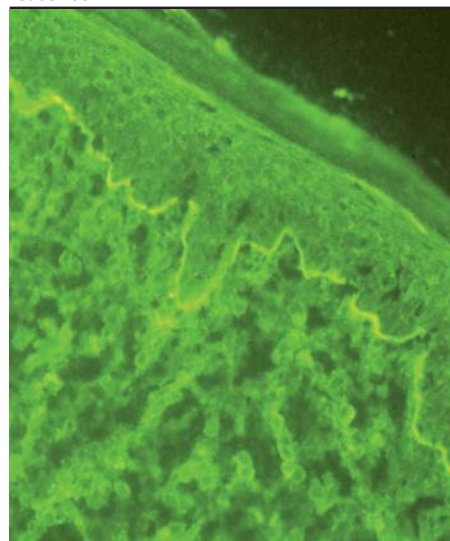
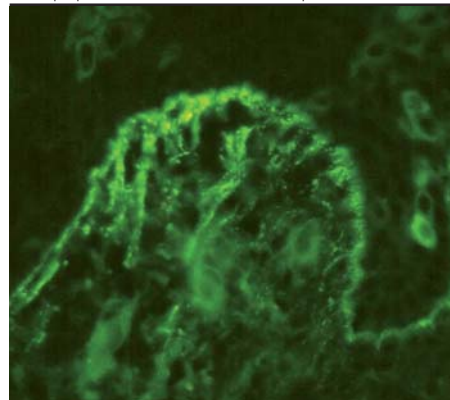
Fluorescenční metody slouží k detekci antigenů i protilátek. Přímá imunofluorescence je metoda sloužící k detekci lokalizace vazebného místa autoprotilátek na příslušný specifický antigen ve vyšetřovaném tkáňovém vzorku. K průkazu se využívají antihumánní imunoglobuliny značené fluorochromy. Nepřímá imunofluorescence pak je schopna detekovat cirkulující protilátky v séru nemocných jedinců. Je metodou dvoukrokovou. Vyžaduje zdroj antigenu (tkáňový substrát), který je inkubován s vyšetřovaným sérem k formaci komplexu antigen – protilátka. Tento komplex je posléze značen antihumánním imunoglobulinem konjugovaným s fluorescenčním barvivem (schéma 2).

1) DIF – přímá imunofluorescence (Direct immunofluorescence)

U onemocnění ve skupině **pemfigu** se v perilezionálním vzorku tkáně prokazuje intercelulárně lokalizovaná, síťovitá fluorescence označující depozita IgG, případně IgA autoprotilátek

v epidermis (obrázek 6). Vedle toho detekujeme i depozita faktoru komplementu C3. U **paraneoplastického pemfigu** je navíc typický nález lineárních depozit IgG a C3 v oblasti DEJ a pozitivní reaktivita krysího epitelu močového měchýře.

U **bulózního pemfigoidu** (obrázek 7) a u **EBA** nalézáme lineární depozita IgG a C3 v oblasti dermo-epidermální junkční zóny. U **lineární IgA dermatózy** (LABD) to jsou pak lineární uložení IgA protilátek v oblasti bazální membrány (obrázek 8, mohou ale být i u IgA varianty EBA). U **herpetiformní dermatitidy** jsou prokazatelná granulární IgA depozita v perilezionální papilární části koria a v dermo-epidermální junkční zóně (obrázek 9). Základem diagnostiky DH tedy zůstává vedle klasické kožní prezentace pečlivé provedení imunofluorescenčního vyšetření (perilezionální biopsie zpracována metodou přímé imunofluorescence) s průkazem granulárních IgA depozit v oblasti dermo-epidermální junkce. Alternativní metodou je užití imunoperoxidázových technik (komplex avidin-biotin-peroxidáza) v lezionální tkáni. Výhodou je detekce protilátek

Obrázek 7. Lineární depozita C3 v oblasti bazální membrány u bulózního pemfigoidu, přímá imunofluorescence**Obrázek 8.** Lineární IgA depozita v oblasti bazální membrány u LABD, přímá imunofluorescence**Obrázek 9.** Granulární depozita IgA ve vrcholcích papil koria u dermatitis herpetiformis

ve formalinem fixovaných vzorcích. Diferenciace DH od bulózní formy lupus erythematosus není těmito technikami možná (možná přítomnost IgA granulárních depozit podél bazální membrány u lupus erythematosus).

2) IIF – nepřímá imunofluorescence (Indirect immunofluorescence)

Vyšetření slouží k průkazu cirkulujících solubilních autoprotilátek v séru nemocných. Nepřímá imunofluorescence je metodou, při

kteří lze užitím tzv. sekundární protilátky (imunoglobulinu) namířené proti humánním imunoglobulinům a značené fluorescenčním barvivem (nejčastěji fluorochromy, např. fluoresceinizothiokyanát (FITC)) prokázat primární protilátky v séru vyšetřovaných nemocných (patogenní autoprotilátky). K ředění vyšetřovaného séra se užívá solný roztok fosfátového pufru (PBS). Použití určitých specifických diluentů s obsahem kalciových iontů, jako např. TAS- Ca^{+2} , (Tris- acetate-buffered saline s 5 mM CaCl^{+2}) podstatně zvyšují senzitivitu vyšetření (16). Ve skupině onemocnění **pemfigu** a **pemfigoidu** se doporučuje užití opičího jícnu jako tkáňového substrátu. Ve většině laboratoří však bývá obtížné získat tento typ tkáňového substrátu, proto jsou užívány i jiné typy tkáňových substrátů, např. epitelu morčecí tlamky (oblast koutků) (obrázek 10). Lze užít i vzorku humánní kůže získaného z kadaverózního materiálu. Pozitivita je prokazována přítomností typické síťovité lineární fluorescence v oblasti mezi epitelálními buňkami. Pro speciální účely k potvrzení určité diagnózy (např. paraneoplastický pemfigus) je nutné užít i jiné epitelální tkáň jako například epitel močového měchýře krys. V případě vyšetření séra u **paraneoplastického pemfigu** je tato typická síťovitá fluorescence prokazována nejen na opičím jícnu, ale i na jícnu morčat a na epitelu močového měchýře krys (substráty bohaté na plakiny). Vyšetření metodou nepřímé imunofluorescence lze u pemphigus vulgaris využít k monitoringu aktivity onemocnění. Zvýšení titrů protilátek je sledováno exacerbací onemocnění, pokles titrů pak znamená příznivou odpověď na zavedenou terapii onemocnění. U onemocnění skupiny pemfigu a pemfigoidu jde o průkaz zejména IgG třídy autoprotilátek (IgG1 a IgG4 subtřídy), je ovšem možný i průkaz IgM třídy imunoglobulinů (20). Kvantitativní analýzu protilátkové aktivity nelze využít k monitoringu aktivity u bulózního pemfigoidu. Výše titrů nekoreluje s aktivitou onemocnění.

U **epidermolysis bullosa acquisita** detekuje vyšetření nepřímou imunofluorescencí IgG cirkulující autoprotilátky namířené proti kolagenu VII-antigenu cílové struktury bazální membrány (9). Přesnější odlišení od bulózního pemfigoidu je však možné užitím techniky „solí štěpeného preparátu“ (viz dále) či imunoelektronmikroskopickým vyšetřením.

Tkáňový substrát opičího jícnu a tkáň pupěčnické šňůry jako zdroje příslušných cílových antigenů lze užít u **dermatitis herpetiformis** k průkazu IgA reaktivity – průkazu tzv. IgA anti-endomysialních protilátek (buňky hladké

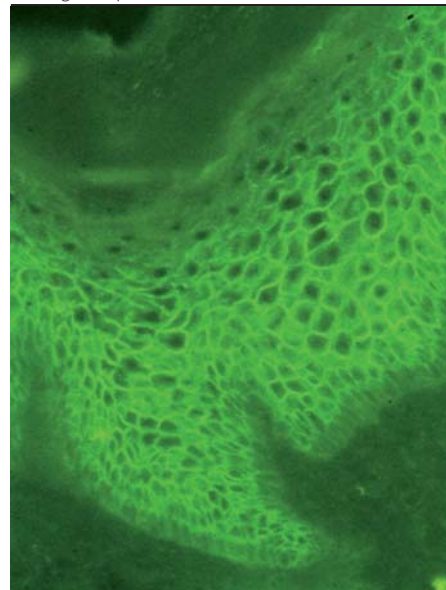
svaloviny). **Sérologické testy** tedy prokazují přítomnost **protilátek proti endomysiu a proti tkáňové transglutamináze** (4). Tyto protilátky je ale možné vyšetřit pomocí ELISA testů. S přítomností výše uvedených protilátek se setkáváme spíše u pacientů s totální atrofii klfů, než u nemocných s parciální formou atrofie, což jsou nejčastější formy postižení střeva u DH. Jako konfirmační testy nejsou tedy u DH příliš senzitivní. Nicméně např. přítomnost EmA protilátek v séru nemocných znamená velmi suspektní diagnózu DH. Stanovení anti-gliadinových protilátek není pro toto onemocnění příliš specifické. Specifické je i stanovení tTG protilátek. **EmA a tTG protilátky jsou tedy sérologickými markery gluten-senzitivní enteropatie u pacientů s DH.** Stanovení obou typů protilátek u nemocných s DH slouží k identifikaci gluten-senzitivní enteropatie a k monitorování efektu bezlepkové diety. Pozitivní nález protilátkové aktivity u DH pacientů znamená indikaci k odbornému gastroenterologickému vyšetření.

Negativní nález EmA a protilátek proti tTG nevylučují diagnózu DH (může jít o DH s latentní gluten-senzitivní enteropatií či DH na dlouhotrvající přísné bezlepkové dietě). Stanovení cirkulujících IgA protilátek proti tTG je považováno v dnešní době za standardní (specifita 98 % a senzitivita 89 % u DH). Komparativní studie užití EmA a tTG esejí ke screeningu pacientů s CS a pacientů s DH na projevy gluten-senzitivní enteropatie vykazaly u obou vysoký stupeň senzitivity a specifity. Z hlediska nákladů se doporučuje provedení testů na protilátky proti tTG jako základní.

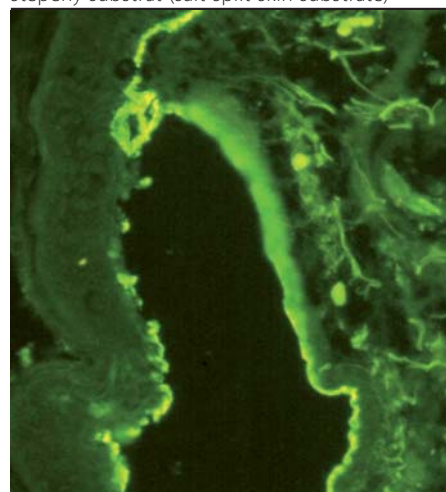
3) SSS – Salt-split skin substrát – substrát štěpený roztokem 1M NaCl

Pro diferenciálně diagnostické určení **bulózního pemfigoidu a EBA** se užívá speciální techniky označované jako „Salt-split-skin substrate“ vyšetření. Inkubací tkáňového vzorku v 1M NaCl dochází k arteficiálně navozenému štěpu v oblasti lamina lucida dermo-epidermální junkční zóny. Metoda i zvyšuje senzitivitu techniky nepřímé imunofluorescence u bulózního pemfigoidu (v solí štěpeném preparátu reaguje až 70 % pacientů s bulózním pemfigoidem). Štěp oddělí antigeny BP (BP 230, BP 180) od autoantigenu EBA (kolagen typu VII). Séra pacientů s **bulózním pemfigoidem vykazují reaktivitu v epidermální části** štěpeného vzorku („střecha puchýře“, obrázek 11), zatímco séra pacientů s **EBA vykazují reaktivitu v dermální části** štěpu („spodina puchýře“, obrázek 12). Pacienti se **slizničním typem pemfigoidu** a protilátkami

Obrázek 10. Nepřímá imunofluorescence na jícnu morčete u pacienta s pemphigus vulgaris, pozitivní nález síťovité fluorescence s průkazem IgG depozit



Obrázek 11. Lineární depozita C3 na epidermální, částečně i na dermální straně solí štěpeného preparátu u bulózního pemfigoidu, solí štěpený substrát (salt-split-skin substrate)



proti lamininu-5 mohou vykazat IgG a IgA reaktivitu též na dermální straně štěpu. U **lineární IgA bulózní dermatózy** vykazuje 60–70 % pacientů IgA reaktivitu v epidermální části štěpu, příležitostně však i s dermální komponentou štěpeného substrátu (obrázek 13). U IgA varianty EBA je reaktivita prokazatelná pouze na dermální straně štěpu.

Cytologické vyšetření materiálu odebraného ze spodiny puchýře

Slouží především k průkazu tzv. akantolytických buněk odebraných ze spodiny puchýře u onemocnění ze skupiny pemfigu. Je jednoduchým, ekonomicky nenáročným vyšetřením vyžadujícím světelný mikroskop. Preparát je barven May-Grünwald-Giemsa barvením (obrázek 14).

Imunoblotting (Westernblot), imunoprecipitace, ELISA testy

Imunoblotting je metodou využívající protilátky k detekci specifických proteinů navázaných na membránu. Proteinový vzorek je elektroforeticky separován. Dostupnost separovaných proteinů užívaným protilátkám (restrikce protilátek polyakrylamidovým gelem) je zajištěna jejich přenosem z gelu membrány na tzv. transferové membrány – nitrocelulózové či PVDF (polyvinylidifluorid). Tyto membrány jsou ve shodném měřítku přiloženy ke gelu (sandwich metoda) a ve speciálním zařízení dojde k elektroforetickému přenosu proteinu za vytvoření přesných replik. Jsou tak přístupné protilátkovým reagentům. Vizualizace k detekci či k vyloučení určitých proteinů je prováděna specifickými protilátkami.

U **pemphigus vulgaris** prokazuje vyšetření specifickou reaktivitu s proteinem o molekulární hmotnosti 130 kD (antigen Desmoglein-3 jako cílový antigen u pemphigus vulgaris). Zdrojem antigenu je humánní epidermální extrakt. Séra nemocných s pemphigus foliaceus prokazují reaktivitu s proteinem o molekulární hmotnosti 150 kD, který odpovídá desmogleinu-1, tedy cílovému antigenu protilátkové aktivity u tohoto onemocnění. Séra u některých nemocných s pemphigus vulgaris mohou vykazat reaktivitu i s antigenem pemphigus foliaceus (Desmoglein-1, 150 kD) (6). To prokazuje úzký vztah a heterogenitu obou typů antigenů u jmenovaných onemocnění. Imunoblottingová analýza tedy dovolí vedle klinického obrazu a dalších vyšetření rozlišení pemphigus vulgaris a foliaceus.

Stejná technika dovolí i průkaz autoprotilátek reagujících s antigenem bulózního pemfigoidu BP180 (BP antigen typ 2, BPAg2). Senzitivita těchto technik u bulózního pemfigoidu je různá. Až 75 % pacientů s **bulózním pemfigoidem** vykazuje reaktivitu s antigenem BPA230 (BPAg1), zatímco reaktivita s antigenem BP180 je udávána okolo 50 %. Pomocí imunoblottingových technik byli výjimečně zjištěni i protilátky reagující s dalšími antigeny v oblasti dermo-epidermální junkce (alpha 6 integrin a laminin-5). V řadě případů prokáže vyšetření imunoblottingovou technikou reaktivitu i v případech, kdy nepřímá imunofluorescence vykazala negativní výsledky. Imunoblotting i ELISA testy lze užít i pro detekci antigenu BP180 u pemphigoid gestationis (8, 13).

U **epidermolysis bullosa acquisita** (EBA) prokáže imunoblotting protein bazální membrány o molekulární hmotnosti 290 kD, který koresponduje s jednoduchým alfa řetězcem

molekuly kolagenu VII – hlavního autoantigenu u EBA (9).

Imunoprecipitace je metodou využívající principy reakce antigen-protilátka k identifikaci proteinů specificky reagujících s protilátkou směsi proteinů tak, že může být zjištěno její množství či fyzikální charakteristiky. Je metodou víceřadovou, která dovolí identifikaci množství a specifikaci určitých proteinů. Tato, ve svém provedení poněkud obtížnější metoda než je imunoblotting, je např. schopná prokázat z kultivovaných keratinocytů či fibroblastů specifický protein v nativní formě, který je rozpoznán specifickými protilátkami pro určité autoimunitní puchýřnaté onemocnění (např. 290 kD protein jako antigen EBA, obdobně jako imunoblotting – viz výše).

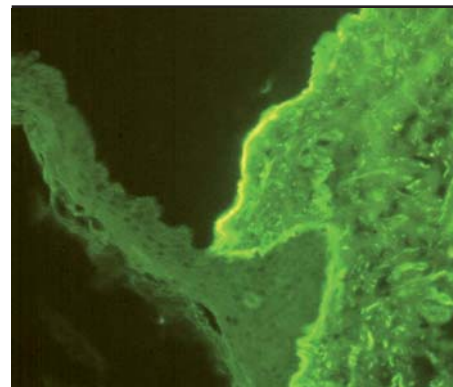
ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), někdy také označovaná jako **EIA** (Enzyme ImmunoAssay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek. Metoda je založena na imunoenzymatické reakci a lze s ní rovněž detekovat i antigeny. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů a to schopnosti proteinů (protilátek) vázat se na povrch umělých hmot a schopnosti vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul. V průkazu specifických protilátek i antigenů existuje široké spektrum různých modifikací ELISA testu: přímá (detekce antigenu) ELISA, nepřímá (detekce protilátek) ELISA či tzv. sandwichové metody testu v přímé i nepřímé variantě. Vizualizace a možnost vyhodnocení je dáno přidáním substrátu v konečné fázi testu, který mění zbarvení a tyto změny je možné hodnotit (chromogenní a fluorogenní substráty).

U nemocných s **bulózním pemfigoidem** je možné při užití rekombinantních proteinů antigenů bulózního pemfigoidu analyzovat specifické IgG protilátky pomocí komerčně dodávaných setů. Sety s užitím antigenu BP180 vykazují reaktivitu u více než 90 % nemocných. ELISA test byl použit i u **pemphigoid gestationis** k monitoringu hladin protilátek (8).

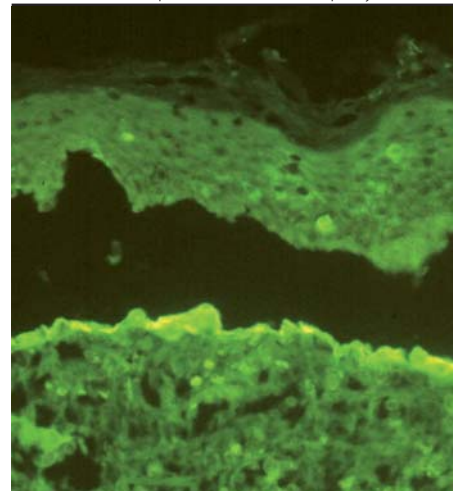
U **epidermolysis bullosa acquisita** je ELISA metoda preferována před užitím imunoblottingu (10), poněvadž využívá rekombinantní nedenedurovaný kolagen VII. Je tedy metodou detekující určitý specifický antigen bazální membrány pacientovými cirkulujícími IgG protilátkami. Je navíc citlivější a více specifickou metodou než imunoblotting.

Všechny výše uvedené metody v této i následné sekci se však neužívají v České republice zcela standardně (nejen vyšší ekonomická zátěž), slouží výzkumným účelům, pouze v některých

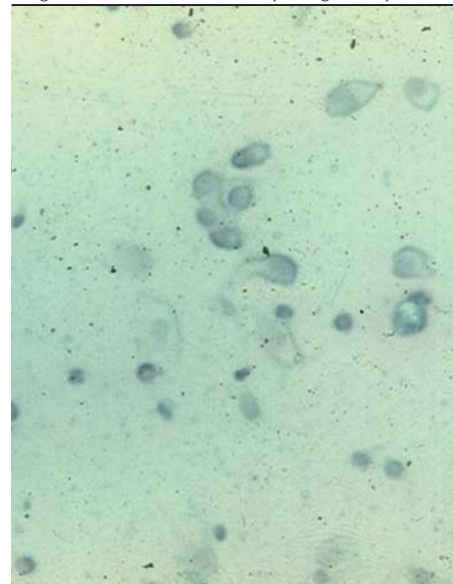
Obrázek 12. Lineární fluorescence depozit IgG na dermální straně štěpu u EBA, solí štěpený substrát



Obrázek 13. Lineární vazba depozit IgA na dermální straně štěpu u LABD, solí štěpený substrát



Obrázek 14. Akantolytické buňky u pemphigus vulgaris v Tzanckově testu, cytologické vyšetření



případech i k diagnostice v našich podmínkách – viz níže. **Problematika těchto vyšetření, jejich pochopení a indikace jsou jistě v základní dermatologické praxi nepřilíš reálné; autor by spíše rád poukázal na rozvoj imunologických metod sloužících k dalšímu pochopení patogeneze těchto závažných onemocnění.**

Testy užívající rekombinantní a definované nativní autoantigeny

Testy detekující protilátky namířené proti Desmogleinu-1 a Desmogleinu-3 (komerční ELISA testy, výrobce MBL Corporation, Japonsko) jsou dnes rutinně užívány u pemfigu. Titry korelují s aktivitou onemocnění. Imunoblotingová vyšetření s rekombinantním Desmogleinem-3 prokázaly dominanci IgG4 třídy imunoglobulinů u aktivního onemocnění (u chronického průběhu prokazatelné jsou IgG1 i IgG4). Tyto diagnostické systémy umožní srovnávat titry a subtypy autoprotiátek s klinickými fenotypy a s průběhem onemocnění. To může podat lepší závěry o průběhu a prognóze těchto onemocnění (21).

Pomocí obdobných testů detekujících protilátky namířené proti NC16A doméně antigenu bulózního pemfigoidu BP 180 (komerční ELISA test, MBL, Japonsko) prokázal Hertl se spolupracovníky i korelaci titrů IgG protilátek namířených proti NC16A doméně antigenu BP 180 (stejně jako titry protilátek namířených proti celé ektodoméně BP 180, nikoliv však titry protilátek namířených proti BP 230 ektodoméně; v některých případech byla zjištěna i korelace mezi výší titrů IgG protilátek proti lamininu-5 a závažností slizničního pemfigoidu (7, 21).

B) Terapie autoimunitních puchýřnatých dermatóz Nutrice, dieta

Rozsáhlá erozivní poškození kůže jsou spojena s alteracemi hemodynamické i metabolické odpovědi organismu, zvyšují se nároky kalorické i proteinové. Ze studií u popálenin vyplývá, že rozvoj nutričního deficitu negativně ovlivní příznivé hojení ran i hemodynamické a metabolické poměry organismu. Erodované léze v dutině ústní a na sliznici gastrointestinálního traktu (orofarynx, jícen) představují překážku normální nutrice postižených jedinců (motilita jícnu, eroze dutiny ústní, striktury, dysfagie, malabsorpce, diarrhoea, dentální problémy). Důležitá je tedy maximální podpora vyvážené nutrice.

V některých pracích se objevily zmínky o možném vlivu určitých potravin na průběh onemocnění pemfigu. Podobně jako u léky-indukovaných pemfigů šlo o vliv potravin obsahujících thiolovou a disulfidovou skupinu. Ty jsou obsaženy především v česneku a v cibuli. Není ale znám signifikantní vliv diety s omezením příjmu těchto složek na průběh onemocnění.

Zjištění, že **bezlepková dieta (BLD)** může u dermatitis herpetiformis přispět k odhojení kožních změn, by mělo vést k označení této diety

jako součásti léčebné metody. Nicméně, určité aspekty této terapie nejsou pacienty s DH vždy pozitivně přijímány (5):

1. **K dosažení kontroly onemocnění musí být BLD striktní.** Při přísné dietě lze dosáhnout snížení, výjimečně vysazení jinak nutné dávky sulfonů v perorální léčbě.
2. Signifikantní redukce dávky per os podávaných sulfonů je možná průměrně **po 6–9 měsících trvání přísné BLD.**
3. Průměrně 2 roky přísné BLD jsou nutné ke kontrole DH bez nutnosti nasazení perorální terapie (když vůbec).

I když BLD znamená pro pacienta řadu restrikcí, jistě její výhody převažují nad systémovou terapií sulfony. U sulfonů se setkáváme s relativně vysokou incidencí vedlejších účinků, navíc pacienti dodržující přísnou BLD udávají zlepšení celkového stavu. Konečně byl prokázán i **protektivní účinek BLD při vývoji lymfomů** (2, 14). Nemocní s DH a s nasazenou BLD musí být pečlivě instruováni a dále sledováni zkušenými odborníky (nutná spolupráce s gastroenterology: dietními odborníky, vhodná je existence zastřešujících společností odborníků i pacientů, dostupnost seznamu bezlepkových potravin, jídelníčku apod.). Bohužel řada dermatologů nemá s bezlepkovou dietou zkušenosti, což je dalším důvodem k nutnosti spolupráce s odborníky v oblasti dietologie a gastroenterologie.

Medikamentózní terapie

Na základě dlouhodobých zkušeností jsou u většiny autoimunitních puchýřnatých dermatóz považovány kortikoidy za lék volby. Mohou být kombinovány s jinými formami imunosupresivní terapie.

V iniciační fázi terapie jsou nasazovány vysoké dávky kortikoidů systémově podávaných, postupně se snažíme o redukci dávky na dávky udržovací (v počátku rychlá, později pomalejší redukce).

Před zahájením imunosupresivní terapie je potřeba vyloučit infekční onemocnění (tbc, HIV, hepatitis B/C) a tumory. U žen ve fertilním věku je nutná důsledná kontracepce. Kontrolované studie k vyhodnocení účinnosti specifických imunosupresiv a imunomodulátorů v léčbě autoimunitních puchýřnatých dermatóz chybí.

Z dalších imunosupresivně působících léků jsou nejčastěji nasazovanými léky s účinnou látkou typu azatioprine, chlorambucil, cyklofosfamid, metotrexát, cyklosporin A a mykofenolát-mofetil.

Kortikoidy systémově podávané jsou základem terapie onemocnění skupiny pemfigu a pemfigoidu. Cílem terapie je dosažení kompletní remise. Počáteční dávky jsou udávány v rozmezích 1–2 mg/kg tělesné hmotnosti. Denní dávky jsou redukovány cca o 10 mg/týden při pečlivém vyhodnocení jakýchkoliv známek klinické rekurence. Při dosažení dávky 60 mg/den lze tuto dávku podávat jednorázově. Při dávce 40 mg/den ekvivalentu prednisonu je další redukce velmi opatrná (ne více jak redukce o 5 mg/týden). Lze přejít i na alternativní režimy (střídání dávek např. 40–30, 40–20 až i 40–0 mg) a postupně i klesat s dávkou celkovou. Při systémové terapii monitorujeme vedlejší účinky steroidů: osteoporózu, diabetes mellitus, hypertenzi, ulcerace gastrointestinálního traktu, aseptické kostní nekrózy, zvýšená rizika infekcí, apod. Vedlejší účinky stále signifikantně přispívají k morbiditě a mortalitě, zejména u onemocnění ze skupiny pemfigu. U bulózního pemfigoidu je klinický průběh relativně benigní ve srovnání s onemocněními skupiny pemfigu, úlohu hraje ale i věk postižených nemocných. Dávkování kortikoidů systémově podávaných je u bulózního pemfigoidu nižší – okolo 0,5 mg/kg/den. Účinnou alternativou je lokální kortikoidní terapie přípravky třídy I (clobetasol propionát, betamethason dipropionát).

Adjuvantní terapie imunosupresiv (medikamentózní)

Adjuvantním imunosupresivum první volby je **azathioprin**. Je podáván v dávkách 1–3 mg/kg/den. Kombinovanou terapií kortikoidy a azatioprinem lze docílit snížení potřebné dávky steroidů. Hepatotoxita, sepse a komplikace z postižení močového traktu jsou nejčastějšími komplikacemi terapie, objevují se nejčastěji během 1. až 2. týdne po zahájení terapie. Nástup účinku trvá ovšem 3–4 týdny. Před zahájením terapie azatioprinem je třeba určit aktivitu enzymu thiopurinmetyltransferázy (TPMT) (7). Při deficitech enzymu může dojít při terapii azatioprinem k závažným myelosupresím.

Cyklofosfamid je užíván u pemfigu (zejména refrakterní formy) i pemfigoidu. Vykazuje potenciální systémovou toxicitu, denní dávka se pohybuje v dávce 1–2 mg/kg. Z vedlejších účinků se mohou objevit suprese kostní dřeně, hemoragie či fibrózy močového měchýře, plicní fibróza, sterilita a zvýšené riziko maligních transformací (močový měchýř, hematologické tumory).

Chlorambucil byl nasazen u těžkých formách pemfigu. Zahajovací terapeutická dávka

je udávána 0,1 mg/kg/den a zhruba po 6 týdnech je redukována na celkovou dávku 2 mg. Při dlouhodobé terapii dochází asi u 30 % pacientů k reverzibilní trombocytopenii (důsledek kumulace).

Cyklosporin A bývá někdy nasazován u pemphigus vulgaris. Randomizovaná, kontrolovaná studie u 33 pacientů (19) nevykázala podstatný rozdíl mezi monoterapií cyklosporinem A v dávce 5 mg/kg/den a kombinovanou terapií Prednisonem v dávce 1 mg/kg/den a cyklosporinem A v dávce 5 mg/kg/den. Vlastní zkušenosti vykazaly poměrně dobrý efekt u nemocných s refrakterním pemphigus vulgaris léčených cyklosporinem A v monoterapii (18). U 1 ze 4 nemocných bylo nutné terapii přerušit pro výskyt závažných vedlejších účinků. Jako adjuvantní terapie s kortikoidy je ale jinými autory efekt zpochybňován (11).

Velmi žádaným lékem adjuvantní terapie řady autoimunitních puchýřnatých onemocnění by byl **mykofenolát – mofetil** (MMF). Cílem této terapie je snížení morbidity a mortality, jakož i současné zvýšení kvality života. Inhibuje inosin-fosfát-dehydrogenázu, enzym nutný pro de novo syntézu purinů. Indikován je často u pemfigů s častými relapsy při dávce Prednisonu ≤ 0,5 mg/kg/den či u klinicky signifikantních vedlejších účinků steroidní systémové léčby. Dávka je udávána v rozmezí 1,5–3 g/den v kombinaci s kortikoidní léčbou. Anhalt dosáhl remise v průměrné době 9 měsíců od zahájení kombinované terapie, průměrný follow-up byl 22 měsíců, u většiny (77 %) pacientů nepozoroval vedlejší účinky terapie MMF, MMF dovolí redukovat potřebnou dávku steroidů. Bohužel terapie je však velmi nákladná – cca 250 liber/měsíc, dále nejsou známy data o dlouhodobém efektu a riziku infekcí (ústní sdělení, EADV Florencie 2004, viz odkaz 1), navíc v České republice je užití nejen z hlediska ekonomického značně problematické i přes registraci výrobku u nás (Cell Cept®).

Sulfony jsou léky volby u dermatitis herpetiformis. Užívají se i u lineární IgA bulózní dermatózy (dospělých i u chronické bulózní dermatózy dětí) a u vzácnějších onemocnění typu IgA pemfigu a u pemfigoidu a pemphigus foliaceus. U onemocnění zprostředkovaných IgG auto-protilátkami mohou být sulfony účinné u jednotek spojovaných histopatologicky s nálezem neutrofilních infiltrátů. Průměrná denní dávka dapsonu je 100 mg/den. Lék již není bohužel v České republice registrován a eventuální zajištění finančního krytí zdravotními pojišťovnami je procesem vyžadujícím nemalé administrativní úkony. Neužívanější terapií u DH je supresiv-

Tabulka 3. Terapie dermatitis herpetiformis alternativy (5)

Název léku	Iniciální dávka	Dávkovací rozmezí
Dapsone	100 mg/den	50 mg ob den až 300 mg/den
Sulfapyridin	2 g/den	0,5 až 4,0 g/den
Sulfametoxy-pyridazin	0,5 g/den	0,5 až 1,5 g/den
Léky ovlivňující výsevy DH		

ní terapie s užitím sulfonů (zejména dapsonu), příležitostně sulfametyxypyridazinu (u osob nad 50 let) a sulfapyridinu (poslední 2 jmenované nejsou v České republice využívány, tabulka 3 dle odkazu 5). Perorální terapie potlačí kožní příznaky. Nemá vliv na další ukládání depozit IgA v kůži ani vliv na střevní sliznici. **Dapsone inhibuje přenos signálu indukovaného chemotaktanty** (inhibice akumulace neutrofilů) a **suprimuje funkce adherence neutrofilů zprostředkované integrinem**. Konečně **snižuje i uvolnění prostaglandinů a leukotrienů** (protizánětlivý efekt). Po nasazení dapsonu se kožní změny začínají odhojovat již v průběhu 2 dnů, do 1 týdne dochází k úplnému odhojení. Při přerušení terapie dochází k rychlému relapsu. Tato **terapie však vyžaduje velmi pečlivý monitoring** pro řadu vedlejších účinků. Dapsone je v organismu metabolizován acetylací nebo N-hydroxylací. N-hydroxylací vzniká toxický metabolit hydroxylamine, produkovaný enzymy cytochromu P 450 a je zodpovědný za vedlejší účinky typu metemoglobinemie, hemolýzy a fatální agranulocytózy. Metemoglobinemie je nejčastějším vedlejším účinkem dlouhodobé léčby. Metemoglobin je za normálních podmínek v organismu odbouráván metemoglobin reduktázou (nikotinamid adenin dinukleotid-dependentní reduktáza). Deficit tohoto enzymu představuje velké riziko pro rozvoj vysokých hladin metemoglobinu (nutný monitoring u osob s deficitem reduktázy a u nemocných s DH a s kardiopulmonálním onemocněním) (17).

Cimetidine redukuje metabolizaci dapsonu na hydroxylamine (nicméně může vykazat své vedlejší účinky), není již ale též v České republice dostupný. Přesný mechanismus vzniku hemolýzy není znám, ale předpokládá se též účast hydroxylaminů. Dvakrát více náchylní k vývoji hemolýzy jsou nemocní s deficitem glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy (G-6-PD). Prvé 3 měsíce terapie je žádoucí vyšetřovat krevní obraz, diferenciální krevní obraz a počet retikulocytů každé 2 týdny, poté v 3měsíčních intervalech.

Částečný protektivní efekt v rozvoji hemolýzy vykazuje podání **vitaminu E** (800 IU/den, po 4 týdny). Agranulocytóza jako idiosynkratická reakce se vyskytuje v době 1 až 3 měsíců po zahájení terapie (zejména u osob starších 60 let).

Rychlý pokles leukocytů pod $4 \times 10^9/l$ je indikací k přerušení terapie.

Popsán byl i syndrom **hypersenzitivity na dapson (Sulfone syndrom)** s projevy hořečky, kožních změn, lymfadenopatie a multiorgánového postižení. Syndrom může být doprovázen žloutenkou, hepatomegalií, fotsenzitivitou, splenomegalií a eosinofilii a s latencí 3 a více měsíců dochází i k rozvoji hypertyreoidizmu.

V současné době se jako smysluplná jeví iniciální terapie dapsonem po dobu nejméně 6 měsíců (krátkodobá kontrola onemocnění) se zavedením přísné bezlepkové diety (dlouhodobé ovlivnění enteropatie) a s postupnou redukcí podávané dávky léku per os dle klinické odpovědi. Při intoleranci dapsonu a sulfonamidů je možné vyzkoušet heparin, eventuálně kombinací léčbu nikotinamidem s tetracykliny.

Terapeutická odpověď u EBA bývá nejobtížnější a nepředvídatelná. Nasazují se kortikoidy i další, výše popsané typy adjuvantní imunosupresivní terapie, u některých případů byl popsán i efekt kolchicinu (15) a nověji jsou popisovány příznivé odpovědi na podání biologické terapie Rituximabem – viz další zmínka níže.

U autoimunitních puchýřnatých dermatóz lze indikovat i **plasmaferézu** a v posledních letech snad ještě více užívanou metodu **imunoadsorpce** s následnou imunosupresivní terapií – slouží k odstranění cirkulujících protilátek různými typy imunoadsorbentů (fenylalanin, tryptofan, dextranové sulfáty, stafylokokový protein A). Imunoadsorpce umožňuje terapii velkých objemů plazmy a nevyžaduje substituci plazmatických komponent. Indikována bývá u pemfigu, jizvících slizničních pemfigoidů a u EBA (7).

Dále byly publikovány zmínky o terapii refrakterních pemfigů **fotoférou** a IgA pemfigu **fotokemoterapií** (metoda PUVA) (7).

U pemfigu (vulgaris, foliaceus a erythematosus) a u bulózního pemfigoidu byla nasazena kombinovaná terapie **tetracyklinem a deriváty nikotinamidu** (dávky 1,5 g/den) (Hertl).

Antimalarika – konkrétně hydroxychloroquine v dávkách 2×200 mg – byl zkoušen u pemphigus foliaceus a dovolil redukcí dávky steroidů.

Deriváty se **solemi zlata** (terapie onemocnění skupiny pemfigu) se z důvodů možnosti vzniku vážných vedlejších účinků užívají dnes velmi zřídka.

Systémově podané **retinoidy** vykazaly efekt v dávkách 50–75 mg/den u pemphigus vegetans či v kombinaci s kortikoidy u IgA pemfigu.

Důležitou adjuvantní imunomodulační terapií pemfigu a epidermolysis bullosa acquisita je léčba **i. v. aplikovanými, vysoko dávkovanými imunoglobuliny (IVIG)**. Celková dávka 2 g/kg/měsíc je rozdělena do 2–5 dnů (7).

Konečně byl u na terapii refrakterních forem paraneoplastického pemfigu (PNP) vyzkoušen i **Rituximab**, monoklonální protilátka proti CD 20 antigenu vyvrážděných a maligních B lymfocytů. PNP velmi špatně reaguje na standardní imunosupresivní terapie. Rituximab (dávka 4x týdně 375 mg/m² s/nebo bez kortikoidů) byl v jednotlivých případech podán i závažných případů pemfigu s velmi dobrým efektem i tolerabilitou (ústní sdělení, EADV Florencie 2004, viz odkaz 12). Náklady jsou ale příliš vysoké (9 500 Eur/pacient). Crichlow popsal efekt terapie u nemocných s EBA rezistentní na terapii (3).

Použité zkratky

BP – bulózní pemfigoid

BP230, BP 180 – antigeny bulózního pemfigoidu (BPAg1, BPAg2)

BLD – bezlepková dieta

DEJ – dermo-epidermální junkce

DH – dermatitis herpetiformis

DIF – direct immunofluorescence, přímá imunofluorescence

EBA – epidermolysis bullosa acquisita

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Essay, enzymová imunoanalýza (EIA)

EmA – antiendomysální protilátka

FITC – fluorescein isothiokyanát, flurochromové barvivo, (Fluorescein isothiocyanate)

G-6-PD – glukóza 6 fosfát dehydrogenáza

HIV – human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti

IIF – indirect immunofluorescence, nepřímá imunofluorescence

IVIG – intravenózně aplikovaný imunoglobulin

LABD – IgA lineární bulózní dermatóza

MBL – Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., biotechnologická společnost

MMF – mykofenolát mofetil

PBS – fosfátový pufovací solný roztok, k ředění séru u nepřímé imunofluorescence (phosphate-buffered saline)

PUVA – fotochemoterapie (psoraleny + UVA)

PVDF – polyvinylidfluoride, typ membrány užívaný k imunoblottingu

SS – salt-split skin substrate, tkáňový vzorek kůže štěpený 1M (molárním) NaCl roztokem

TMPT – thiopurinmethyltransferáza

tTG – Tissue transglutaminase, tkáňová transglutamináza

Literatura

1. Anhalt GJ. American Academy of CME, Meet the Authors: Insights That Impact Your Patients With Pemphigus, 13th Congress of the European Academy of Dermatology, November 18th, 2004, Firenze, Italy.
2. Bose SK, Lacour JP, Bodokh I, Ortonne JP. Malignant lymphoma and dermatitis herpetiformis, *Dermatology* 1994; 188: 177–181.
3. Crichlow SM, Mortimer NJ, Harman KE. A successful therapeutic trial of rituximab in the treatment of a patient with recalcitrant, high-titre epidermolysis bullosa acquisita, *Br. J. Dermatol.* 2007; 156(1): 194–196.
4. Dieterich W, Laag E, Bruckner-Tuderman L, Reunala T, Karpati S, Zágoni T, Riecken EO, Schuppan D. Antibodies to tissue transglutaminase as serological markers in patients with dermatitis herpetiformis, *J. Invest. Dermatol.* 1999; 113: 133–136.
5. Fry L. Dermatitis herpetiformis: problems, progress and prospects, *Eur. J. Dermatol.* 2002; 12(6): 523–531.
6. Hashimoto T, Amagai M, Garrod DR, Nishikawa T. Immunofluorescence and immunoblot studies on the reactivity of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera with desmoglein 3 and desmoglein 1, *Epithelial Cell Biol.* 1995; 4(2): 63–69.
7. Hertl M. Epidermale Struktur- und Adhäsionsmoleküle, *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie* 2004. Springer Verlag, 2005: 279–285.

8. Chan L. Bullous pemphigoid, e-medicine, <http://emedicine.medscape.com/article/1062391-diagnosis>.

9. Chan L, Woodley D. Epidermolysis bullosa acquisita, e-medicine, <http://emedicine.medscape.com/article/1063083-overview>.

10. Chen M, Chan LS, Cai X, O' Toole EA, Sample JC, Woodley DT. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita, *J Invest Dermatol.* 1997; 108(1): 68–72.

11. Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryn JC. Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus, *Arch. Dermatol.* 2000; 136: 868–872.

12. Joly P, French Study Group on Autoimmune bullous disorders. Treatment of severe types of pemphigus using Rituximab (mabthera): preliminary results. 13th Congress of the European Academy of Dermatology, November 19th, 2004, Firenze, Italy.

13. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting, *J. Immunol.* 1986; 136(4): 1231–1235.

14. Lewis HM, Reunala T, Garioch JJ, et al. Protective effect of gluten-free diet against development of lymphoma in dermatitis herpetiformis, *Br. J. Dermatol.* 1996; 133: 363–367.

15. Marinkovich MP. Electronic Textbook of Dermatology: Blistering diseases, <http://www.telemedicine.org/blisters.html>.

16. Matis WL, Anhalt GJ, Diaz LA, Rivitti EA, Martins CR, Berger RS. Calcium Enhances the Sensitivity of Immunofluorescence for Pemphigus Antibodies. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 89: 302–304.

17. Nicolas MEQ, Krause PK, Gibson LE, Murray JA. Dermatitis herpetiformis – review, *Int. J. Dermatol.* 2003; 42(8): 588.

18. Salavec M. Autoimunitní puchýřnaté dermatózy, *Postgraduální medicína*, 2007; 9(5): 519–526.

19. Toth GG, Jonkmann MF. Therapy of pemphigus, *Clin. Dermatol.* 2001; 19: 761–767.

20. Zeina B, Mansoor S. Pemphigus vulgaris, e-medicine, <http://emedicine.medscape.com/article/1064187-diagnosis>.

21. Zillikens D. Epidermale Struktur- und Adhäsionsmoleküle, *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie* 2004. Springer Verlag, 2005: 8–14.

MUDr. Miloslav Salavec, CSc.

Klinika nemocí kožních a pohlavních,
Fakultní nemocnice
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové
salavecm@post.cz