

*A Debreceni Orvostudományi Egyetem Bőrgyógyászati Klinika
(igazgató: Hunyadi János dr., egyetemi tanár) közleménye*

Salt-split skin technika alkalmazása bullosus pemphigoidban Application of salt-split technique in bullous pemphigoid

DOBRÁNSZKY IRÉN DR., HUNYADI JÁNOS DR.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők salt-split skin technika alkalmazásáról számolnak be három bullosus pemphigoidos beteg kapcsán. Direkt és indirekt salt-split skin módszerrel mindhárom esetben a dermoepidermális hasadék epidermális szélé mentén láttak lineáris fluoreszcenciát. Ezen technika segítséget nyújt a dermoepidermális junkció területére lokalizálódó bullózus bőrbetegségek elkülönítésében.

Kulcsszavak:
**salt-split skin technika –
bullosus pemphigoid**

SUMMARY

Salt-split skin technique was used in three patients suffering from bullous pemphigoid. Linear fluorescence positivity was observed along the epidermal side of the dermo-epidermal cleavage. This method is a useful, simple technique to differentiate autoimmune bullous skin diseases localized in the dermo-epidermal junction.

Key words:
**salt-split skin technique –
bullous pemphigoid**

A bullózus bőrbetegségek számos tagjánál a patológiai történések a dermoepidermális junkció területére esik. Ezen betegcsoportot, ahová a klasszikus bullosus pemphigoid (BP), a pemphigoid különböző formái, a hegesedő pemphigoid (CP), a herpes gestationis (HG), a linearis IgA bullosus dermatosis, a gyermekkori chronicus bullosus dermatosis, az epidermolysis bullosa acquisita (EBA), a bullosus LE (BLE), a linearis IgM dermatosis és tágabb értelemben a lichen planus pemphigoides és a porphyria cutanea tarda is tartozik, szövettanilag szubepidermális hólyagképződés és a papilláris dermiszben észlelhető különböző mértékű gyulladásos infiltrátum jellemez (4, 6). Az autoantitest képzéssel járó bullózus dermatózisokban immunhisztokémiai vizsgálattal immunglobulinokból és/vagy komplementből álló lineáris depozitumok mutathatók ki a dermoepidermális határ területén (4). A klinikai kép sokszor segít a korrekt diagnózis felállításában, de előfordul, hogy a klinikai megjelenés, a szövettani és immunfluoreszcenciás (IF) vizsgálat olyanira hasonló, hogy rutin IF vizsgálattal nem sikerül a pontos azonosítás. Ez a nehézség elsősorban a BP és EBA vonatkozásában

okoz problémát (3, 4). Ilyen esetben a diagnózis felállításához speciális vizsgálat végzése szükséges, mint például az úgynevezett antigén-mapping eljárás (4, 7), immunoblot vagy immunprecipitációs módszer (4, 6), immunoelektronmikroszkópos és salt-split skin technika (4, 7). Direkt salt-split skin módszerrel a hólyagos beteg 1M-os NaCl oldattal hasított perilezionális bőrmintáját reagáltatjuk fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelzett antihumán immunglobulinnal vagy complementtel. Indirekt salt-split skin módszerrel egészséges egyénből származó, 1M-os NaCl oldattal hasított bőrmintákhoz adjuk a hólyagos beteg keringő antitesteket tartalmazó szérumának hígítási sorát. A módszer azon a megfigyelésen alapszik, mely szerint az 1M-os NaCl oldatban inkubált bőr a bazálmembránban a lamina lucida mentén epidermális és dermális részre hasad. Ez lehetővé teszi a bazálmembrán ellenes ellenanyagok kötődési helyének a lamina lucidához viszonyított meghatározását. Jelen közleményben három bullosus pemphigoidos eset ismertetésével a direkt és indirekt salt-split skin technika használhatóságát támasztjuk alá.

Anyag és módszer

Indirekt salt-split skin módszernél plasztikai műtéten átesett egészséges egyénből vett bőrmintát, direkt salt-split skin módszernél a hólyagos beteg perilezionális bőrmintáját 1M-os NaCl oldatban +4°C-on 36–48 óráig inkubáltuk, melynek eredményeként az epidermisz és a dermisz között hasadék keletkezett. Az inkubálás ideje a vizsgált bőr vastagságától és a kimetszés helyétől függött. Az 1M-os NaCl-ban végzett inkubálást követte a fiziológiás NaCl oldattal és a desztillált vízzel történő átmosás, majd -70°C-ra történő fagyasztás. A preparátumokból 5 µm vastagságú kriosztát metszeteket készítettünk, melyeket 10 percig acetonnal fixáltunk, majd pH 7,4-es PBS oldatban inkubáltuk 10 percig. Indirekt salt-split skin módszernél a beteg szérumának hígítási sorával 30 perces inkubálás történt, majd ezt követően FITC-cel jelzett antihumán IgG-vel vagy C₃-mal kezeltük a metszeteket, melyek mosás utáni lefedése PBS-glicerinnel 1:1 arányú keverékével történt. Direkt salt-split skin módszernél 1:8-as hígítású antihumán IgG-vel vagy C₃-mal történt a metszetek kezelése. A preparátumokat Carl Zeiss immunfluoreszcenciás mikroszkóppal vizsgáltuk.

Esetismertetés

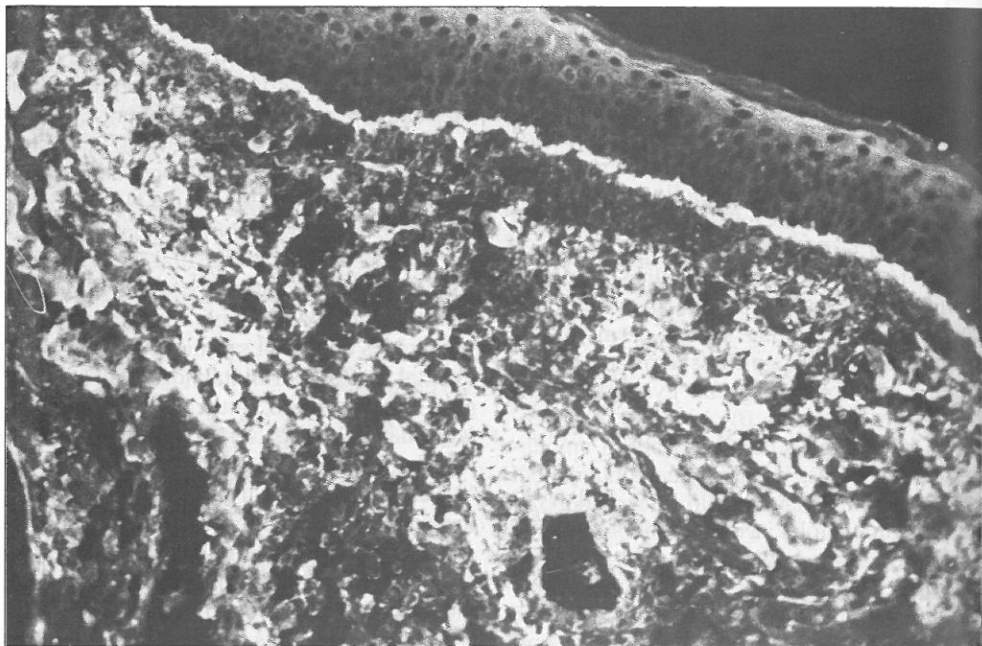
1. eset

H. A. 71 éves férfibeteg családi anamnézise negatív. Egyéni anamnéziséből 5 éve meglévő hiper-

tenziója emelhető ki. Bőrbetegsége 1992 márciusban kezdődött. Először a végtagokon, majd a törzsen is gyulladt alapon hólyagcsák, hólyagok keletkeztek. A tünetek felvetették az autoimmun hólyagos bőrbetegség lehetőségét. Az elvégzett szövettani és immunfluoreszcenciás vizsgálat bullosus pemphigoidot igazolt. Kortikoszteroid, Azathioprin kombinált kezelésre tünetmentesedett, 1992 novemberben és 1993 márciusban kisebb kiterjedésben, majd 1994 novemberben generalizáltan recidiváltak bőrtünetei.

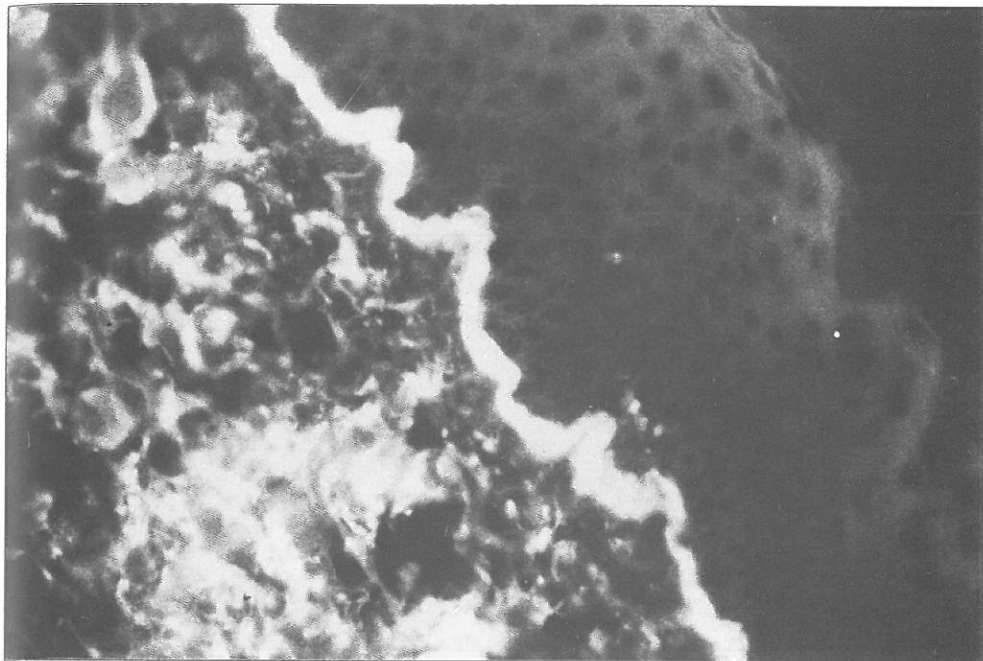
Felvételi állapot: végtagokon, törzsen hiperémiás alapon számos, csoportos, feszes falú, lencsényi, borsónyi, babnyi hólyagcsa, hólyag, illetve helyenként eróziók.

Szövettani vizsgálat: Szubepidermális hasadék-képződés, a papilláris dermiszben gyulladással járó infiltrációval, számos eozinofil sejttel. A DIF vizsgálat antihumán IgG-vel és C₃-mal szubepidermális lineáris pozitívítást mutatott. IIF vizsgálattal 1:128-as titerig láttunk a bazálmembrán mentén lineáris pozitívítást (1., 2. ábra). Direkt salt-split skin módszerrel a dermoepidermális hasadék epidermális széle mentén láttunk FITC-cel jelzett antihumán immunglobulinnal és C₃-mal lineáris pozitívítást. Indirekt salt-split skin technikával is a hasadék epidermális széle mentén észleltük antihumán IgG-vel és C₃-mal a lineáris fluoreszcenciát 1:256-os titerig. A Tzanck-kenet és a Nikolsky-tünet negatív volt.



1. ábra

DIF: szubepidermális lineáris fluoreszcencia antihumán IgG/FITC-cel (nagyítás 100x) 1. eset



2. ábra

IIF: szubepidermális lineáris pozitívítás antihumán IgG/FITC-cel – 1:128 szérumszínítési hígítás (nagyítás 250x) 1. eset

Laboratóriumi eredmények: We: 10 mm/6, Fvs: 9,0 G/l, Htk: 0,43, Hb: 132 g/l, Thr: 220 G/l, vércukor: 5,0 mmol/l, se összfehérje: 62 g/l, SGOT: 19 U/l, SGPT: 12 U/l, γ GT: 31 U/l, LDH: 319 U/l. Mellkas röntgen, hasi UH, gyomor-bél passzázs, urológiai vizsgálat: eltérés nélkül.

Kezelés: napi 100 mg Kortikoszteroid (Di Adreson inj.) és 150 mg Azathioprin alkalmazása mellett tünetmentesedett, majd a gyógyszeradagokat fokozatosan csökkentettük. Jelenleg másodnaponkénti 12 mg Metypred és 50 mg Imuran mellett tünetmentes.

2. eset

K. Gy-né 80 éves nőbeteg családi anamnézise negatív. Egyéni anamnéziséből kiemelendő, hogy 5 éve agyvérzése volt, mely miatt bal oldali hemiparézis alakult ki. Bőrbetegsége 1994 januárban kezdődött. Végtagokon, törzsön gyulladt alapon változó nagyságú hólyagok jelentek. Otthonában Calcimusc injekciót és kis dózisú Prednison-lont kapott, melyre nem javult. 1994. február 1-jén igen kiterjedt bőrtünetekkel vettük fel a DOTE Bőrklinikára.

Felvételi állapot: törzsön, végtagokon, hiperémiás alapon számos borsónyi, cseresznyéni, diónyi, többnyire feszes falú bulla, máshol eróziók. A klinikai tünetek alapján elsősorban a bullosus pemphigoid, illetve a paraneoplasticus syndroma lehetősége merült fel.

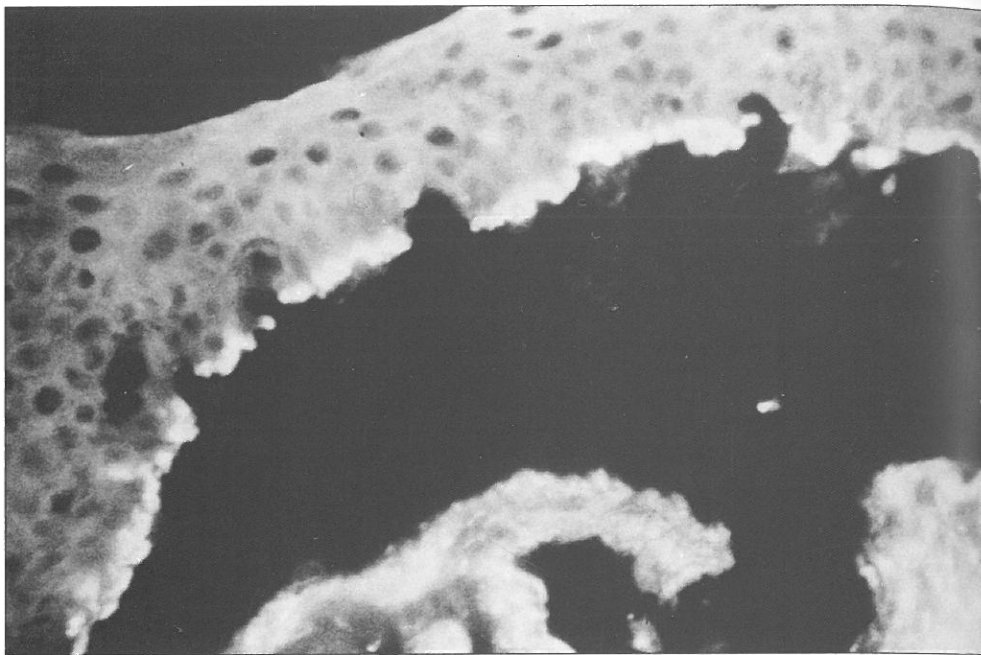
Szövettani vizsgálat: Szubepidermális hasadék-képződés, a papilláris dermisben és a hólyagúrt-ban közepes intenzitású gyulladásos sejt beszűrődés számos eozinofil sejtrel. DIF vizsgálatnál FITC-cel jelzett antihumán IgG-vel és C₃-mal szubepidermális lineáris pozitívítást láttunk.

IIF módszerrel 1:128-as titerig észleltünk szubepidermális lineáris fluoreszcenciát. Direkt salt-split skin módszerrel a dermoepidermális hasadék epidermális széle mentén láttunk FITC-cel jelzett antihumán IgG-vel lineáris pozitívítást. Indirekt salt-split skin módszerrel is a hasadék epidermális széle mentén volt kifejezett a lineáris fluoreszcencia 1:256-os titerig (3. ábra). Tzanck-kenet és Nikolsky-tünet negatív volt.

Laboratóriumi eredmények: We: 16 mm/h, Fvs: 6,8 G/l, Htk: 0,43, Hb: 138 g/l, Thr: 166 G/l, vércukor: 5,6–7,4 mmol/l, vizelet acetone: negatív, se összfehérje: 54–62 g/l, mellkas röntgen-vizsgálat lényeges kóros eltérés nélkül, hasi UH vizsgálat cholelithiasist igazolt.

Az elvégzett noninvaszív vizsgálatokkal belservesi tumort nem sikerült igazolni, az invazív vizsgálatokat a beteg általános állapota nem tette lehetővé.

Kezelés: 125 mg Metypred, 100 mg Imuran kezelés mellett a bőrtünetek fokozatosan visszafejlődtek, a gyógyszeradagokat csökkentettük és háromhetes kezelés után tünetmentesen bocsátottuk otthonába. Jelenleg másodnaponkénti 12 mg



3. ábra

Indirekt salt-split skin technika: a dermoepidermális hasadék epidermális széle mentén lineáris fluoreszcencia antihumán IgG/FITC-cel – 1:256 szérumszórás (nagyítás 250x) 3. eset

Metypred és napi 50 mg Imuran gyógyszeradagok mellett tünetmentes.

3. eset

H. S.-né 61 éves nőbeteg családi anamnézise negatív. Egyéni anamnéziséből 6 éve meglévő diabetes mellitusa emelhető ki, mely orális antidiabetikumokkal és diétával egyensúlyban tartható. Bőrbetegsége felvétele előtt három héttel, 1994 februárban kezdődött. Először az alkarokon, majd testszerte nagy, feszes falú hólyagok keletkeztek. Otthonában antihisztamin és kis dózisú kortikoszteroidot kapott, melyre nem javult.

Felvételi állapota: végtagokon, törzsön, hiperémiás alapon számos babnyi, mogyorónyi, helyenként zölddiónyi, feszes falú hólyag volt. A klinikai kép elsősorban a bullosus pemphigoid diagnózist vetette fel.

Szöveti vizsgálat: Szubepidermális hasadékképződés, a papilláris dermisben számos eozinofil sejtet tartalmazó gyulladásos sejtes beszűrődés, ér körüli infiltrációt, duzzadt érendotelt mutatott. DIF vizsgálat FITC-cel jelzett antihumán IgG-vel szubepidermális, lineáris pozitívítást adott. IIF vizsgálat 1:64 sítelig mutatott szubepidermális, lineáris pozitívítást. Direkt salt-split skin módszerrel a dermoepidermális hasadék epidermális széle mentén lineáris pozitívítást láttunk FITC-cel jelzett antihumán IgG-vel. Indirekt salt-split skin technikával a hasadék epidermális széle

mentén folytonos lineáris fluoreszcenciát láttunk, antihumán IgG-vel 1:128-as titerig. Tzanck-kenet és Nikolsky-tűt negatív.

Laboratóriumi eredmények: We: 8 mm/6, Fvs: 11,7–8,9 G/l, Htk: 0,46, Hb: 150 g/l, Thr: 230 G/l, vércukor: 5,6–8,1–7,1 mmol/l, vizelet acetone: negatív, cukorürítés: 50–70 g/nap, se összfehérje: 62 g/l, májenzimek eltérés nélkül. Mellkas röntgen: enyhe fokú jobb kamra megnagyobbodást, a hasi UH kis fokú diffúz májkárosodást, valamint cholelithiasist igazolt.

Kezelés: napi 100 mg, azaz (1 mg/tskg) Di Adreson inj. és napi 100 mg Imuran adására fokozatosan tünetmentesedett. Jelenleg másodnaponkénti 12 mg Medrol és napi 50 mg Imuran mellett tünetmentes.

Megbeszélés

A salt-split skin technikát Gammon és mtsai (1, 2) írták le a BP és EBA elkülönítésére. Az első leírás szerint a humán bőrben 1M-os NaCl-oldatban történő inkubálás hatására egy olyan mesterséges rés keletkezik, amely a dermoepidermális junction belül a lamina lucida vonalában helyezkedik el. Így a lamina lucida alkotóelemei a hasadék mindkét oldalán kimutathatóak, a lamina denza a hasadék dermális felszínére kerül.

Klein és mtsai (9), valamint *Kárpáti és mtsai* (7) véleménye szerint a lamina lucida a hámon belül „locus minoris resistentiae”-ként viselkedik. Vannak, akik a szeparáció létrejöttét proteolitikus enzimek felhasználásával is segítik. Walzer és mtsai ajánlották először a thermolysin használatát (14). *Klein* megfigyelése szerint, ha proteolitikus enzimet használtak, a szeparálódás nem mindig a lamina lucida területén jött létre (10). Több szerző véleménye szerint a lamina lucidán keresztül haladó dermoepidermális hasadék létrehozására az 1M-os NaCl oldattal történő szeparálás a legalkalmasabb eljárás. Ez a módszer jól reprodukálható és nem okoz lényeges károsodást a dermoepidermális junction ultrastrukturális szerkezetében (9). *Kelly és mtsai*. (8) szerint a dermoepidermális szétválástódás hamarabb létrejön, ha az 1M-os NaCl oldatban történő inkubálást szobahőmérsékleten végezzük, ugyanis az alacsonyabb hőmérséklet csökkenti a proteáz-aktivitást. Először *Gammon és mtsai* végeztek indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálatot a NaCl split-skin szubsztrátumon. Leírták, hogy a hasadék epidermális széle mentén vagy mindkét felszínen észlelhető lineáris fluoreszcencia a BP-ra, míg a dermális szélen lévő az EBA-ra és BLE-re jellemző.

Később ők vezették be a direkt salt-split skin technikát a BP, EBA, BLE-es betegből származó biopsziás anyagon (2). A BP a hólyagfedélen, az EBA, BLE a hólyagalapon adott lineáris fluoreszcenciát. *Zone és mtsai* (18) BP-os betegeknél a hólyagfedélen, az EBA és BLE esetében pedig a hólyagalapon figyeltek meg lineáris fluoreszcenciát. *Hintner és mtsai* (5) párhuzamosan végeztek nagyszámú EBA és BP-ból származó bőr-szubsztrátumokon immun-elektronmikroszkópos vizsgálatot és direkt salt-split skin technikát. Az eredmények egybeestek a két eljárás során. *Logan és mtsai* (10) nem mindig találtak korrelációt az immunelektronmikroszkópos és a direkt salt-split skin vizsgálat eredményei között. *Zhu* (18), *Machado és mtsai* (11) teljes korrelációt találtak az indirekt salt-split skin és Western-immunoblot technika eredményei között. Leírták, hogy az indirekt salt-split skin technika sokkal érzékenyebb, mint az intakt humán bőrön, vagy majom oesophaguson elvégzett IIF eljárás. *Willsteed* (15), *Peters* (13) igazolták, hogy az indirekt salt-split skin módszer végtitère

gyakran 2–4 titerfokozattal magasabb, mint ha intakt humán bőrt használunk. Ezt a megállapítást saját vizsgálataink is megerősítik. *Nieboer és mtsai* (12), valamint *Yaoita és mtsai* (17) immunelektron-mikroszkópos vizsgálattal kimutatták, hogy azon betegségek, amelyeknél az IgG immunlerakódás a lamina lucida területére esik a BP, CP, vagy HG, míg a sublamina denza területén lévő IgG depozitumok az EBA és BLE diagnózist adják. *Woodley és mtsai* (16) szerint több oka van, hogy a BP-ot és az EBA-t el kell különíteni egymástól. a) hozzájárul az EBA klinikai spektrumának pontosabb megismeréséhez. b) az EBA szisztémás megbetegedéssel társulhat. c) a pontos definiálással meg lehet jósolni a betegség klinikai lefolyását.

Szemben a költséges, időigényes immunelektron-mikroszkópos vizsgálattal, a direkt és indirekt salt-split skin technika egyszerű, könnyen kivitelezhető, hasznos módszer az autoimmun hólyagos megbetegedések elkülönítésében.

IRODALOM

1. *Gammon, W. R. és mtsai*: J. Invest. Dermatol. 82, 139 (1984)
2. *Gammon, W. R. és mtsai*: J. Invest. Dermatol. 84, 472 (1985)
3. *Gammon, W. R. és mtsai*: J. Autoimmun 4, 59 (1991)
4. *Gubo, G. P. és mtsai*: H+G 68, 573 (1993)
5. *Hintner, H. és mtsai*: J. Invest. Dermatol. 76, 113 (1981)
6. *Husz S., Korom I.*: Bőrgyógy. Vener. Szle. 70, 149 (1994)
7. *Kárpáti S. és mtsai*: Arch. Dermatol. Res. 283, 529 (1991)
8. *Kelly, S. E., Wosnarowska F.*: Br. J. Dermatol. 118, 31 (1988)
9. *Klein, G. F. és mtsai*: Br. J. Dermatol. 109, 499 (1983)
10. *Logan, R. A. és mtsai*: Br. J. Dermatol. 117, 471. (1987)
11. *Machado, P. H. és mtsai*: Br. J. Dermatol. 126, 236 (1992)
12. *Nieboer C. és mtsai*: Br. J. Dermatol. 102, 383 (1980)
13. *Peters, M. S.*: J. Cutan. Pathol. 18, 1 (1991)
14. *Walzer C. és mtsai*: J. Invest. Dermatol. 92, 78 (1989)
15. *Willsteed, E. M. és mtsai*: J. Cutan. Pathol. 18, 8 (1991)
16. *Woodley, D. T.*: Arch. Dermatol. 126, 229 (1990)
17. *Yaoita, H. és mtsai*: J. Invest. Dermatol. 76, 288 (1981)
18. *Zhu, X. J. és mtsai*: Arch. Dermatol. 126, 171 (1990)
19. *Zone, J. J. és mtsai*: J. Clin. Invest. 85, 812 (1990)

Érkezett: 1995. 03. 10. Közlésre elfogadva: 1995. 04. 19.