

Klinička bolnica »Dr Zdravko Kučić«  
Dermatovenerološka klinika Medicinskog fakulteta, Rijeka  
predstojnik prof. dr A. Vukas

## **Dijagnostičke mogućnosti indirektno imunofluorescentne pretrage u nekih autoimunih bolesti s oralnim promjenama**

Z. PERIŠ i M. GLIGORA

U dermatologiji postoji nekoliko bolesti koje su često popraćene promjenama na sluznici usne šupljine. Neke od njih mogu započeti promjenama u usnoj šupljini i perzistirati mjesecima, bez ikakvih kožnih manifestacija. Najvažnije su one iz skupine autoimunih bolesti, kao što su vulgarni pemfigus, kronični i sistemski eritematodes i pemfigoidi. Uz dosadašnje mogućnosti njihove dijagnostike citološkim i histološkim pretragama, u novije se vrijeme rade i imunofluorescentne pretrage, koje često igraju presudnu ulogu u njihovoj dijagnostici. Budući da su u laboratoriju za imunopatologiju naše klinike uvedene te suvremene metode, vjerujemo da će njihov prikaz i upoznavanje s indikacijama za izvođenje tih pretraga, biti zanimljivi prvenstveno stomatolozima i oralnim patolozima. Prikazani će biti naši rezultati, postignuti indirektnom imunofluorescentnom pretragom, u bolesnika s promjenama na oralnoj mukozi.

### IMUNOLOŠKE KARAKTERISTIKE

Vulgarni pemfigus i bulozni pemfigoidi spadaju u skupinu autoimunih bolesti specifičnih za organ, tj. oštećenje i autoprotutvari su ograničeni na kožni organ i to na međustanične prostore, ako je riječ o pemfigusu, odnosno na zonu bazalne membrane ako je riječ o pemfigoidima (R o i t t<sup>1</sup>). U serumu bolesnika s pemfigusom nalazimo cirkulirajuće protutvari protiv intercelularnih prostora (IC Ab), a u oboljelih od pemfigoida, protutvari protiv zone bazalne membrane (BMZ Ab). Beutner i Jordon<sup>2</sup> su prvi prikazali imunofluorescentnom metodom IC Ab oboljelih od vulgarnog pemfigusa, a Jordon i sur.<sup>3</sup> BMZ Ab u oboljelih od buloznog pemfigoida.

Eritematodes spada u skupinu autoimunih bolesti, u kojih oštećenja i autoprotutvari nisu ograničene na jedan organ, već su rasprostranjene u organizmu u obliku oštećenja vezivnog tkiva, s fibrinoidnom nekrozom (R o i t t<sup>1</sup>, J a b l o n s k a

i Chorzeliski<sup>4</sup>, Gligora<sup>5</sup>). U oboljelih od eritematodesa su primarno dijagnostički važne protutvari protiv jezgre (antinuklearne protutvari-ANA), usmjerene protiv njezinih sastavnih dijelova: dezoksinukleoproteina, nukleoproteina, DNK i histona (Tan i Vaughan<sup>6</sup>). Friou i sur.<sup>7</sup> su prikazali tehniku fluorescentne metode prikaza ANA u serumu oboljelih od eritematodesa. Osim ANA, u oboljelih od eritematodesa, možemo naći i druge autoprotutvari: protutvari protiv poprečno prugastog i glatkog mišićja, anticitoplazmatske protutvari, mitohondrijske i mikrosomske protutvari (Hughesi i Lachmann<sup>8</sup>).

## INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENTNA PRETRAGA (Beutner i sur.<sup>9</sup>)

### Materijal i metode

Za IIF pretragu seruma treba uzeti 10 cc krvi, koja se centrifugira 10 minuta, s 1500 okretaja u minuti. Serum se pohranjuje u hladnjak na 4°C, gdje može ostati do 5 dana. Na nižim temperaturama, npr. od -70°C, u hladnjaku može zadržati imunopatološka svojstva i do godinu dana, ali pod uvjetom da se ne odmrzava više nego jedanput ili dva puta, jer može doći do negativizacije rezultata odnosno pada titra protutvari. Kao tkivni test antigen Andersen i Hale (1973) preporučuju jednjak majmuna, što u svojoj eksperimentalnoj studiji potvrđuju Beutner i sur.<sup>9</sup> (1973). Mi, međutim, upotrebljavamo humanu nepčanu tonzilu (Gligora<sup>10</sup>, 1977) koju, nakon što smo je zamrznuli sa CO<sub>2</sub>, odmah po operativnom zahvatu prenosimo na objektnom disku u Cryo-Cut Microtome (A O Co Buffalo, NY, USA), i režemo na debljinu od 4 do 6 mikrona, prihvaćamo na nefluorescirajuće odmašćeno predmetno stakalce (tvrtke Socorex, Švicarska) debljine 0,8 do 1 mm, držimo na sobnoj temperaturi 20 minuta do pola sata, kapamo kontrolni pozitivni i negativni serum i ogledne serume razrijeđene s puferskom otopinom fosfatne soli (PBS) pH 7,2 — 7,4, držimo u vlažnoj komori pola sata. Nakon toga ispiremo u PBSu 2 puta po 10 minuta, kapamo polivalentni konjugat antihumani serum obilježen bojom FITC (Globulines de lapin anti-globulines d'homme, faiblement marquée, Code No 74521, Institute Pasteur, Paris) i ponovo držimo u vlažnoj komori 30 minuta, ispiremo u PBSu dva puta po 10 minuta, brišemo oprezno stakalce, kapamo preparate na glicerini u PBSu u omjeru 1:10, postavljamo pokrovno stakalce, i preparati su spremni za očitavanje. Serume razrjeđujemo 1:10 do 1:5120.

### Mikroskopiranje (Ploem<sup>11</sup>)

Fluoromikroskopija je obavljena na mikroskopu Zetopan Reichert (Austria), incidentnom iluminacijom, živinom lampom HBO 200, podražajnim filterom BG 12 i narančastim zaštitnim filterom, kombiniranom rasvjetom, kondenzorom za tamno polje, na koji smo nakapali glicerini — PBS.

### Snimanje

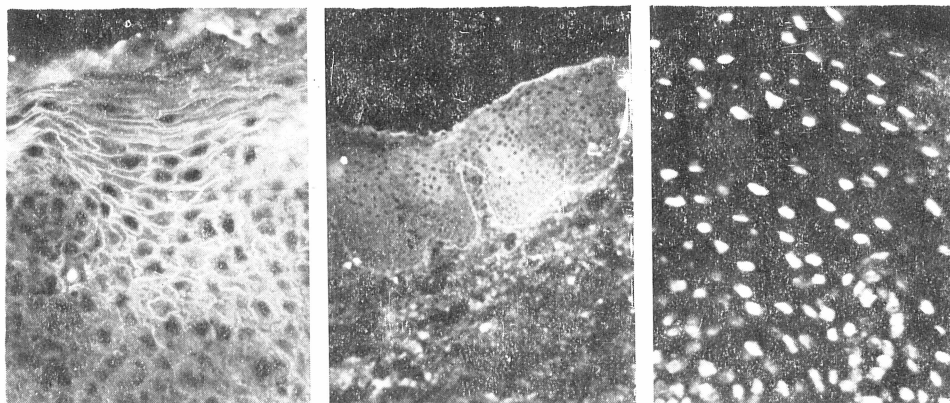
Fotografirali smo Reichert Photoautomatic kamerom na filmovima EFKE-Izopan. Vrijeme ekspozicije iznosilo je 8 do 15 minuta.

## REZULTATI

U trojice bolesnika s pravim pemfigusom, u jednog s buloznim pemfigoidom, u jednog s kroničnim diskoidnim i u jednog bolesnika sa sistemnim eritematodesom, liječenih u našoj klinici u 1976, bile su utvrđene i oralne promjene. Indirektna imunofluorescentna pretraga svih oboljelih dala je pozitivni rezultat (tab. 1).

| Bolesnik | Spol | Dob | Dijagnoza                    | Test-antigen           | Protutvari | Titar |
|----------|------|-----|------------------------------|------------------------|------------|-------|
| I. P.    | Ž.   | 72  | Pemphigus vulgaris           | Humana nepčana tonzila | IC Ab      | 1:80  |
| J. Nj.   | M.   | 71  | Pemphigus vulgaris           | Humana nepčana tonzila | IC Ab      | 1:80  |
| M. M.    | M.   | 71  | Pemphigus erythematosus      | Humana nepčana tonzila | IC Ab      | 1:80  |
| M. R.    | Ž.   | 77  | Bulozni pomfigoid            | Humana nepčana tonzila | BMZ Ab     | 1:160 |
| R. F.    | Ž.   | 30  | Erythematodes chr. discoides | Usnica zamorca         | ANA        | 1:20  |
| R. P.    | Ž.   | 34  | Erythematodes systemicus     | Usnica zamorca         | ANA        | 1:320 |

Na tkivnom test-antigenu humanoј nepčanoј tonzili (G l i g o r a<sup>19</sup>) prikazali smo IC Ab (sl. u oboljelog od vulgarnog pemfigusa i MBZ Ab u oboljelog od buloznog pemfigoida (sl. 2), dok smo na usnici zamorca prikazali antinuklearne protutvari (sl. 3).



1

2

3

Sl. 1. Indirektna IF metoda. Serum bolesnika s vulgarnim pemfigusom. Snažno bojenje intercelularnih prostora epitela humane nepčane tonzile polivalentnim konjugatom (anti-humani serum obilježen s FITC, Institute Pasteur, Paris, Code No 74521, F/P molarnog omjera 2—3, IIF Chessboard titracija 1:64, Plateau titar 1:1280, Plateau and point 1:512, jediničnost 16). — Sl. 2. Indirektna imunofluorescencija seruma bolesnika s buloznim pemfigoidom. Tktivni test antigen i konjugat kao na slici 1. Jasno se vidi linearna fluorescencija zone bazalne membrane. — Sl. 3. IIF metoda. Serum bolesnika sa sistemnim eritematodesom. Na tkivnom test-antigenu usnice zamorca uočljiva je fluorescencija jezgara homogenog oblika. Polivalentni konjugat kao na prethodnim slikama.

## DISKUSIJA

U prošlosti je laboratorijska dijagnostika opisanih autoimunih bolesti bazirala na histološkim nalazima. U novije vrijeme, imunofluorescentno ispitivanje seruma znatno pridonosi dijagnostici autoimunih bolesti. To je posebice važno za bolesti, koje se primarno javljaju na mukozama usne šupljine, u kojih je i histološka dijagnostika, zbog specifičnih uvjeta, bila znatno teža, nego na samom kožnom organu. Treba naglasiti, da se intraepitelne akantolitičke bule mogu javiti i prilikom drugih bolesti, kao što su bulozni oblik morbusa Dariera, neke prolazne akantolitičke dermatoze, pyoderma vegetans i Haley - Haley bolest. No, niti jedna od tih bolesti ne daje karakterističan fluorescentni nalaz, niti direktnom niti indirektnom metodom, koji je inače karakterističan baš za vulgarni pemfigus.

Možemo reći, da su rezultati postignuti indirektnom imunofluorescentnom pretragom bolesnika liječenih u našoj klinici u 1976, a u kojih su bile utvrđene i oralne promjene, veoma dobri. IIF je u svih bolesnika dala pozitivan nalaz. Smatramo da treba osobito naglasiti, da je u naših bolesnika, prvi put dokazano da humana nepčana tonzila može poslužiti kao tkivni test antigen pemfigusa, za dokazivanje IC Ab i buloznog pemfigoida za BMZ AB, što će u mnogome pojednostaviti primjenu te metode u spomenutih bolesti. Antinuklearne antitvari su dokazane na već poznati način upotrebom usnice zamorca, kao tkivnog test antigena.

Usprkos izvrsnim rezultatima pretraga IIF u naših bolesnika, napominjemo da te metode nisu za sve autoimune bolesti jednako pouzdane. Tako su Jablonška i sur.<sup>12</sup> dokazali na većem broju bolesnika da se IC Ab, u oboljelih od vulgarnog pemfigusa, javljaju u više od 95% bolesnika. U oboljelih od diskoidnog eritematodesa se ANA nalaze u serumu 15% do 40% oboljelih, a u oboljelih od sistemnog eritematodesa, u 84% oboljelih, s dijagnostičkom vrijednošću titra 1:160 ili više (Nisengard i sur.<sup>13</sup>). Istina je da ANA mogu naći i u oboljelih od drugih autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, Sjögrenov sindrom, progresivna sklerodermija) pa čak i u zdravih ljudi, ali nikad u titru većem od 1:160 (Nisengard i sur.<sup>14</sup>). U oboljelih od eritematodesa postoje i ostali imunopatološki parametri dijagnostičke vrijednosti, npr. nalaz LE-stanica i zrnatih depozita imunoglobulina i komplementa u bioptičkom materijalu ruba lezije u oboljelih od kroničnog diskoidnog eritematodesa, odnosno dorzalne strane nepromijenjene karpalne regije ili kože leđa i to na epidermo-kutanoj granici (Cormane<sup>15</sup>). Depoziti Ig iC se nalaze i u oralnim lezijama (Nisengard i sur.<sup>13</sup>).

Intercelularna antitijela se u početnim fazama bolesti, u oboljelih od pemfigusa, teže dokazuju, osobito ako se radi o početnim lezijama lokaliziranim samo na sluznici usne šupljine. Tada se indirektna imunofluorescentna pretraga ponavlja svakih 10 do 20 dana. Ako se radi o titru do 1:20, bez kliničkog tipičnog nalaza, treba izvršiti direktnu imunofluorescentnu pretragu. Titar 1:40 i viši, važan je čak i ako su klinički i histološki nalazi atipični. Visina titra oboljelih od pemfigusa varira prema težini bolesti, a komparacija titra, u određenom vremenskom razdoblju, može poslužiti kao indikator stanja bolesnika i kao vodič u provođenju terapije.

U oboljelih od buloznog pemfigoida, kao što je već i spomenuto, nalazimo antitvari protiv zone bazalne membrane, u više od 80% slučajeva, s aktivnim promjenama. Titar je često viši od 1:160. Budući da visina titra oboljelih od buloznog

pemfigoida ne ovisi o težini bolesti, titar se ne može upotrijebiti kao indikator stanja bolesnika. Protutvari, naime, preostaju često i nakon nestanka svih kliničkih manifestacija.

U oboljelih od benignog pemfigoida mukoza (cikatrijski pemfigoid), postotak serološki pozitivnih slučajeva je znatno niži, nego u oboljelih od buloznog pemfigoida pa se zbog toga, u oboljelih od te bolesti, često služimo i direktnom imunofluorescentnom pretragom (D a n t z i g<sup>10</sup>, 1973).

## ZAKLJUČAK

Indirektna imunofluorescentna pretraga oboljelih od autoimunih bolesti, s promjenama na oralnoj mukozi, ima veliku dijagnostičku vrijednost. No ipak, njezina vrijednost nije jednaka za sve spomenute bolesti. IIF metoda je najpouzdanija u oboljelih od vulgarnog pemfigusa, sistemnog eritematodesa i buloznog pemfigoida, dok je manje pouzdana ako je riječ o diskoidnom eritematodesu i cikatrijskom pemfigoidu (benigni pemfigus mukoza). Visina titra u oboljelih od pojedinih bolesti (pemfigus i sistemni eritematodes), može biti važna, ne samo u postavljanju dijagnoze, već i kao indikator stanja bolesti i vodič u provođenju terapije.

## Sažetak

Opisane su mogućnosti dijagnostike indirektnom imunofluorescentnom pretragom oboljelih od autoimunih bolesti, s promjenama na oralnoj mukozi. Izneseni su rezultati indirektno imunofluorescentne pretrage u prvih šest bolesnika (pemfigus vulgaris, bulozni pemfigoid, eritematodes kronikus diskoides i eritematodes sistemikus). Kao tkivni test antigen prvi puta je upotrijebljena humana nepčana tonzila, za oboljele od pemfigusa za IC Ab, a za oboljele od buloznog pemfigoida, za BMZ Ab. Usnica zamorca je poslužila za antinuklearne antitvari.

## Summary

### DIAGNOSTICAL POSSIBILITIES OF INDIRECT IMUNOFLUORESCENT EXAMINATION IN SOME AUTOIMMUNE DISEASES WITH CHANGES OF THE ORAL MUCOSE

Described are the diagnostical possibilities of the indirect immunofluorescent examination in some autoimmune diseases with changes of the oral mucose. Given are results of the IIF examination in the first six patients (pemphigus vulgaris, bullous pemphigoid, lupus erythematoses chronicus discoides and lupus erythematoses systemicus). The tissue test antigen was the epithel of the human tonsil used in pemphigus for IC Ab, and in bullous pemphigoid for BMZ Ab. The lip of guinea-pig was used for the antinuclear antibodies.

## Zusammenfassung

### DIAGNOSTISCHE MÖGLICHKEITEN DER INDIREKTEN IMMUNOFLUORESZENTEN UNTERSUCHUNG VON MANCHEN AUTOIMMUNEN ORALEN ERKRANKUNGEN

Es wurde die Möglichkeit der Diagnostik mit indirekter immunofluoreszenter Untersuchung bei autoimmunen Erkrankungen mit Veränderungen an der Mundschleimhaut, beschrieben. Die Resultate dieser Untersuchungen bei den ersten sechs Patienten (Pemphigus vulgaris, bulöses Pemphigoid, Erythematodes chronicus discoides, und Erythematodes systematicus), sind mitgeteilt. Als Gewebstest-Antigen wurde zum ersten Mal die menschliche Gaumentonsille bei Pemphigus für IC Ab, beim bulösen Pemphigoid für BMZ Ab, verwendet. Die Lippe eines Kaninchens diente als antinukleärer Gegenkörper (ANA).

## LITERATURA

1. ROITT, I.: Osnove imunologije, Medicinska naklada, Zagreb, 1974
2. BEUTNER, E. H., JORDON, R. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117:505, 1964
3. JORDON, R. E., BEUTNER, E. H., WITBSKY, E., BLUMENTHAL, G., HALE, W. L., LEVER, W. F.: J.A.M.A., 200:751, 1967
4. JABLONSKA, S., CHORZELSKI, T. P.: Lupus erythematosus, u knj., FRY, L., SEAH, P. P.: Immunological aspects of skin diseases, MTP CO LTD, Lancaster, 1974
5. GLIGORA, M.: Lij. vjes., 1977 (u tisku)
6. TAN, E. M., VAUGHAN, J. H.: Antinuclear antibodies: significance of biochemical specificities, u knj.: BEUTNER, E. H., i sur.: Immunopathology of the skin: Labeled antibody studies, Hutchinson Ross, Inc, Stroudsburg PA, 1973
7. FRIOU, G. J., FINCH, S. C., DETER, K.D.: J. Immun., 80:324, 1958
8. HUGHES, G. R. V., LACHMANN, P. J.: Systemic lupus erythematosus, Blackwell scientific publications, Oxford, 1975
9. BEUTNER, E. H., HALE, W. L., NISENGARD, R. J., CHORZELSKI, T. P., HOLUBAR, K.: Defined immunofluorescence in clinical immunopathology, u knj.: BEUTNER E. H. i sur.: Immunopathology of the skin, labeled antibody studies, Hutchinson Ross, Inc, Stroudsburg PA, 1973
10. GLIGORA, M.: Epithel of the human palatal tonsil, New test antigen in IIF examinations (for pemphigus and pemphigoid antibodies and the ANA, (poslano u tisak u Dermatologica, Basel) 1977
11. PLOEM, J. S.: Immunopathology of the skin: labeled antibody studies, Hutchinson Ross, Inc, Stroudsburg PA, 1973
12. JABLONSKA, S., CHORZELSKI, T. P., BEUTNER, E. H., HOLUBAR, K.: Indications for skin and serum immunofluorescent studies u knj.: BEUTNER, E. H. i sur.: Immunopathology of the skin: labeled antibody studies, Hutchinson Ross, Inc, Stroudsburg PA, 1973
13. NISENGARD, R. J., JABLONSKA, S., BEUTNER, E. H., SHU, S., CHORZELSKI, T. P., JARZABEK M., BLASZCZYK, M., RZESA, G.: Oral surg., Oral med., Oral path., 40:365, 1975
14. NISENGARD, R. J., JABLONSKA, S., CHORZELSKI, T. P., BLASZCZYK, M., JARRETT, C., BEUTNER, E. H.: Arch. Dermat., 111:1298, 1975
15. CROMANE, R. H.: Lancet, 1:534, 1964
16. DANTZIG, P.: Arc. Dermat., 108:264, 1973