

**Aus der Universitäts-Hautklinik der Heinrich–Heine-Universität Düsseldorf**

**Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka**

**Das vernarbende Pemphigoid:  
Klinik, Histologie, Immunfluoreszenzbefunde  
und Blasentypisierung mittels Kollagen IV-  
Darstellung**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Anke Hofmann**

**2005**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan

Referent: Prof. Dr. M. Megahed

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Becker

## Abkürzungen

BMZ	Basalmembranzone
BP	bullöses Pemphigoid
BPAg1	bullöses Pemphigoid Antigen 1
BPAg2	bullöses Pemphigoid Antigen 2
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
ECP	Eosinophilic cationic protein
EBA	Epidermolysis bullosa aquisata
GSH	Genitalschleimhaut
H	Haut
HSP	Heat shock protein
IF	Immunfluoreszenz
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
KD	Kilodalton
KSH	Konjunktivalschleimhaut
LPP	Lichen planus pemphigoides
LR	Lichen ruber
MSH	Mundschleimhaut
PDGF	Platelet derived growth factor
SST	Salt-Split-Technik
TGF beta	Transforming growth factor beta
VP	Vernarbendes Pemphigoid

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>2</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Subepidermale blasenbildende Haut - und Schleimhauterkrankungen	6
1.2 Definition des bullösen vernarbenden Pemphigoids	8
1.3 Historie	8
1.4 Epidemiologie	9
1.5 Klinisches Bild	10
1.5.1 Schleimhautbefall	10
1.5.2 Hautbefall	13
1.5.3 Klinische Sonderformen	13
1.5.3.1 VP vom Typ Brunsting-Perry	13
1.5.3.2 Paraneoplastisches VP	14
1.5.3.3 Vegetierendes VP	14
1.6 Differentialdiagnose des VP	15
1.7 Histologie des VP	16
1.7.1 Histologie der kutanen Läsionen	16
1.7.2 Histologie der mukösen Läsionen	17
1.7.3 Lichenoides VP	17
1.8 Immunhistochemische Befunde	18
1.8.1 Direkte Immunfluoreszenz (DIF)	18
1.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	19
1.8.3 Salt-Split-Technik (SSS)	19
1.9 Elektronenmikroskopische Befunde	20
1.9.1 Immunelektronenmikroskopie	20
1.10 Ätiologie und Pathogenese des VP	20
1.10.1 Hemidesmosomen	22
1.10.2 Lamina lucida	22
1.10.3 Lamina densa	23
1.10.4 Sublamina densa	23
1.10.5 Hypothetische pathogenetische Prozesse des VP	23
1.10.6 Zielantigene des VP	26

1.10.6.1	Bullöses Pemphigoid Antigen 2 (BP180)	27
1.10.6.2	Laminin 5 und Laminin 6	28
1.10.6.3	$\alpha 6\beta 4$ -Integrin	30
1.10.6.4	Weitere potentielle Zielantigene des VP	31
1.10.7	Die Rolle des Entzündungsgeschehens in der Pathogenese des VP	32
1.11	Klinischer Verlauf und Therapie des VP	33
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>36</b>
<b>3.</b>	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>Beschreibung der verwendeten Materialien, Methoden und Geräte</b>	<b>38</b>
4.1	Herstellung histologischer Präparate	38
4.2	Histologische Begutachtung	39
4.3	Die direkte Immunfluoreszenz (DIF)	40
4.4	Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	41
4.5	Typ-IV-Kollagen-Färbung	42
4.6	Die Salt-Split-Technik (SSS)	42
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
5.1	Demografische Daten	44
5.1.1	Alters- und Geschlechtsverteilung	45
5.1.2	Diagnosestellung/Latenzzeit	45
5.2	Klinische Ergebnisse	45
5.2.1	Betroffene Schleimhautregion/Organ	45
5.2.2	Klinische Manifestation (Bildteil)	48
5.2.2.1	okulärer Befall	48
5.2.2.2	enoraler Befall	51
5.2.2.3	genitaler Befall	54
5.2.2.4	kutaner Befall	55
5.2.3	Klinischer Verlauf	56
5.2.4	Therapie	56
5.3	Histologische Ergebnisse	57
5.3.1	Histologie der Mundschleimhaut (MSH)	58
5.3.2	Histologie der Konjunktivalschleimhaut (KSH)	59
5.3.3	Histologie der Genitalschleimhaut (GSH)	62
5.3.4	Histologie der Haut	62
5.3.5	Lokalisationsabhängige histologische Besonderheiten des VP	63
5.3.6	Histologische Varianten	66
5.3.6.1	VP mit Fibrose	67
5.3.6.2	VP ohne Fibrose	74
5.3.6.3	VP mit lichenoidem Infiltrat	76

5.4	Immunfluoreszenzdiagnostik	79
5.4.1	Direkte Immunfluoreszenz (DIF)	79
5.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	82
5.4.3	Beurteilung der Immunfluoreszenzdiagnostik	83
5.4.4	Lokalisation und IF-Diagnostik	83
5.4.4.1	Ausmaß des Schleimhautbefalls	83
5.4.4.2	Konjunktivales VP	84
5.4.4.3	Enorales VP	86
5.4.4.4	Lichenoides Infiltrat und IF	87
5.5	Typ-IV-Kollagen-Färbung	88
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
6.1	Die Histologie des VP in Abhängigkeit der betroffenen Lokalisation	91
6.2.	Das Merkmal der Fibrose in der Histologie des VP	96
6.3	Die Histologie der lichenoiden Variante des VP	100
6.4	Der diagnostische Wert der IF-Diagnostik	102
6.5.	Der diagnostische Wert der Typ-IV-Kollagen Darstellung	107
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>120</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Subepidermale blasenbildende Haut- und Schleimhauterkrankungen

Die Epidermis und die Dermis werden durch eine kompliziert aufgebaute Basalmembranzzone (BMZ) miteinander verbunden (Abbildung 1). Die BMZ ist eine komplexe Struktur, die die Kohärenz der epidermalen und dermalen Komponenten des Hautorgans gewährleistet. Sie ist elektronenmikroskopisch in vier ultrastrukturelle distinkte Zonen einteilbar (1). Von epidermal nach dermal sind diese Zonen die hemidesmosomale Verbindung der basalen Keratinozyten, die Lamina lucida, die Lamina densa und die Ankerfibrillen der oberen Dermis.

Diese Strukturen bestehen biochemisch aus zahlreichen Proteinen, die miteinander interagieren und für die Kohärenz und Stabilität des Hautorgans verantwortlich sind (1,2).

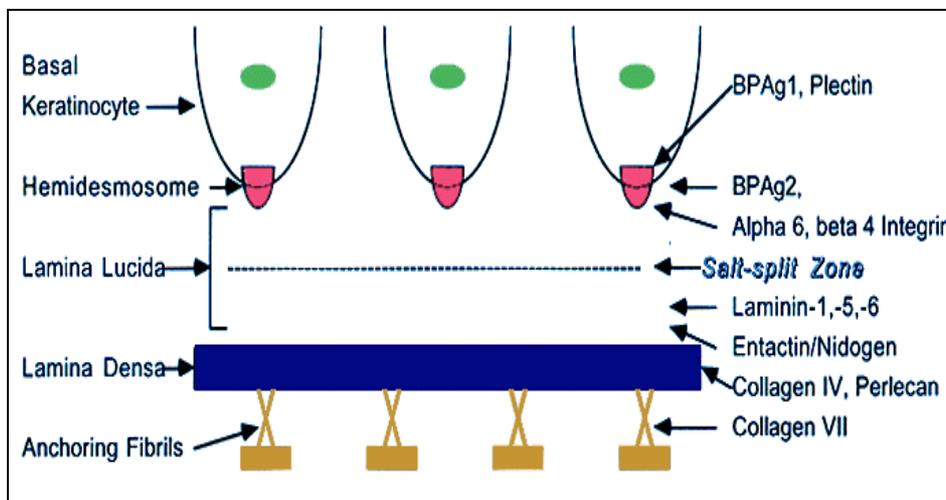


Abb.1: Schematische Darstellung der BMZ und die Lage der Strukturproteine (2)

Funktionsstörungen oder genetische Strukturdefekte dieser Proteine führen zu einer Kontinuitätstrennung im Bereich der BMZ. Diese Störung kann in jeder der oben beschriebenen Zonen zu einem Kohärenzverlust und damit zu einer

subepidermalen Blase führen. Erkrankungen mit der Folge einer Kontinuitätstrennung zwischen Epidermis und Dermis werden als bullöse subepidermale Dermatosen bezeichnet (2,3,4,5).

Diese bullösen subepidermalen Dermatosen sind hinsichtlich Klinik, Histologie, Immunologie und Immunbiologie eine sehr heterogene Krankheitsgruppe. Diese Erkrankungen können nach Megahed in 4 Gruppen eingeteilt werden (6). Folgende Aufstellung gibt hierüber einen kurzen Überblick:

#### **1. Bullöse Autoimmunerkrankungen**

---

Hierbei werden bei den Patienten hochaffine zirkulierende Antikörper gegen ein oder mehrere Bestandteile der BMZ nachgewiesen. Die nachfolgende Einteilung in einzelne klinische Entitäten ist Bestandteil der aktuellen Diskussion und es ist sehr wahrscheinlich, dass aufgrund zukünftiger molekularbiologischer Untersuchungen Erkrankungen unter einem Namen subsummiert werden oder auch neue Erkrankungen hinzugefügt werden müssen.

1. Bullöses Pemphigoid (BP)
2. Herpes gestationes
3. Vernarbendes Pemphigoid (VP)
4. Lichen planus Pemphigoides
5. Dermatitis herpetiformes Duhring
6. Epidermolysis bullosa aquisisa (EBA)
7. Lineare IgA-Dermatose
8. Bullöser systemischer Lupus erythematodes

#### **2. Hereditäre subepidermale bullöse Dermatosen**

---

Ursächlich hierfür sind Mutationen in den Genen, die für die Codierung der BMZ-Proteine verantwortlich sind.

1. Epidermolysis bullosa junctionalis
2. Epidermolysis bullosa dystrophicans

#### **3. Stoffwechselbedingte subepidermale bullöse Dermatosen-**

---

1. Porphyrin cutanea tarda

#### **4. Arzneimittelinduzierte subepidermale bullöse Dermatosen**

---

1. Stevens-Johnson –Syndrom
2. Toxische epidermale Nekrolyse (Lyell-Syndrom)
2. Bullöse Arzneimittelreaktion

Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit wird ausschließlich das vernarbende Pemphigoid aus der Gruppe der bullösen Autoimmunerkrankungen sein.

## **1.2. Definition des bullösen vernarbenden Pemphigoids**

Das vernarbende Pemphigoid (VP) ist eine seltene, chronisch fortschreitende, subepidermale bullöse Autoimmunerkrankung, die vorwiegend die Schleimhäute befällt (7,8). Aufgrund der chronischen Entzündungsreaktion mit konsekutiver Fibrose kann ein Funktionsverlust von Organen erfolgen. Das VP stellt eine eigene Entität dar und umfasst eine immunpathologisch heterogene Gruppe mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen. Mit zunehmendem Nachweis der Zielantigene wird an Stelle der früher üblichen Klassifikation nach klinischen Gesichtspunkten vielleicht bald eine nosologische Zuordnung nach Zielantigenen möglich sein (9, 19).

## **1.3 Historie**

Die Erstbeschreibung des VP läßt sich nicht genau datieren. Wahrscheinlich wurde der erste Fall eines okulären VP von Wichmann 1794 beschrieben (10). Das Fehlen von genaueren diagnostischen Methoden hatte zur Folge, dass das VP unter anderen blasenbildenden Erkrankungen subsummiert wurde. 1858 berichtete Cooper über einen Patienten mit Erosionen und Vernarbungen der Konjunktiva sowie transienten nicht vernarbenden Blasen an der Haut (11). Auch Sattler, Graefe und Arlt beschrieben 1879 während einer „Tagung der deutschen ophthalmologischen Gesellschaft“ den typischen klinischen Verlauf eines okulären VP (12).

1911 wurde von Thost der benigne Schleimhautpemphigus als ein Prozess beschrieben, der mit Vernarbungen an den Schleimhäuten einhergeht (13).

Aufgrund histologischer Untersuchungen trennte Civatte 1943 (14) als auch Lever 1951 und 1953 (15, 16) das VP von anderen bullösen Dermatosen. Die Erkrankung wurde von Lever als „*gutartiges Schleimhautpemphigoid*“ bezeichnet. Diese Verharmlosung wird allerdings dem tatsächlichen klinischen Bild nicht gerecht.

#### **1.4 Epidemiologie**

Das VP ist weltweit verbreitet und zeigt keine ethnische oder geografische Prädisposition. Die Inzidenz liegt bei geschätzten 0,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/Jahr (17, 18). Die exakte Inzidenz ist schwer zu ermitteln und liegt wahrscheinlich höher, da Patienten mit minimalem Befall oft nicht oder nur spät adäquat diagnostiziert werden (19).

In der Ambulanz der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität wurden im Zeitraum von 6 Jahren (1994-2000) 25 Fälle eines VP diagnostiziert. Einige dieser Patienten wurden sowohl von der Universitätsaugenklinik, als auch von der Universitätszahnklinik Düsseldorf konsiliarisch vorgestellt.

Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten beträgt etwa 2:1 (7, 8). Der Krankheitsbeginn liegt zumeist zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. In seltenen Fällen kann die Erkrankung auch Kinder und Jugendliche betreffen. Eine regionale oder ethnische Häufung ist nicht bekannt (7, 8, 20).

In verschiedenen Studien wurde versucht einen Zusammenhang zwischen HLA-Mustern und Assoziation zu dem VP festzustellen. Eine Assoziation mit HLA-DR4 und –DQw3 konnte in zwei Studien nachgewiesen werden (21, 22). Chan et al. beschrieben 1997 in einer Untersuchung an 21 Patienten einen signifikanten Nachweis von HLA-DQB1\*0301 Allele bei 16 von 21 (76 %) mit okulärem Pemphigoid (mit oder ohne weitere Schleimhaut/Hautbeteiligung) im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die nur in 33% der Fälle diese Allele aufwies.

Interessanterweise konnte bei Patienten mit reiner Hautbeteiligung keine signifikante Assoziation zu HLA-DQB1\*0301 nachgewiesen werden (23, 24).

## **1.5           Klinisches Bild**

Die elementare Primäreffloreszenz des VP ist eine pralle Blase, die nach ihrer Ruptur eine Erosion hinterläßt. Diese heilt langsam und meistens unter Narbenbildung ab. Das VP befällt das mehrschichtige unverhornte Epithel, insbesondere die Mundschleimhaut, die Konjunktiven, Anogenitalbereich, Nasenschleimhaut, Larynx, Trachea, Ösophagus und gelegentlich auch die Haut (7, 8).

### **1.5.1         Schleimhautbefall**

Zu 85% ist primär die enorale Schleimhaut betroffen. Die initiale Symptomatik ist sehr diskret und zeigt sich klinisch meistens als desquamative Gingivitis. Diese desquamative Gingivitis ist nicht pathognomisch für das VP, sondern zeigt sich auch bei anderen Erkrankungen wie Lichen planus, Pemphigus foliaceus, bullösem Pemphigoid und der allergischen Kontaktstomatitis.

Sie erscheint als fokale oder generalisierte Rötung und Schwellung, die mit Schmerzen einhergeht.

Im Vollbild finden sich dann häufig Bläschen oder Blasen, die leicht rupturieren und zu unregelmäßig konfigurierten Erosionen oder Ulcerationen führen. Diese heilen verzögert unter streifig-retikulärer Narbenbildung ab.

Außer der Gingiva kann auch der harte und weiche Gaumen sowie die Zunge und die Wangenschleimhaut befallen werden (25, 17).

Schmerzhafte Schlucken, blutiger Schnupfen, Heiserkeit und Stimmverlust deuten auf einen Befall der Uvula, der Nasenschleimhaut, des Larynx und der Trachea hin.

Eine nasopharyngeale Mitbeteiligung wird in 20% der Fälle beschrieben (27). Sie beginnt gewöhnlich am Nasenseptum als verkrustete Erosion. Intakte Blasen werden selten gesehen. Die Mitbeteiligung des Nasopharynx wird meist im Zusammenhang mit einem ausgeprägten Befall des oberen Gastrointestinaltraktes beschrieben (26).

Weniger häufig wird der Befall des Larynx mit 8% angegeben und zeigt sich initial durch chronische Halsschmerzen und Heiserkeit. Blasen werden nur selten gefunden. Progressiver Befall kann zu Ödemen, Vernarbungen und Strikturen führen (26, 27, 7).

Der Ösophagusbefall wird in 4% der Fälle beobachtet (27). Häufig manifestieren sich die Veränderungen als Ulcera im unteren Ösophagusdrittel. Nach der Entzündung kommt es zu Adhäsionen der Schleimhaut und nach mehreren Rezidiven zu Strikturen und Stenosen, die die Nahrungsaufnahme schmerzhaft und, allerdings sehr selten, fast unmöglich machen.

Die Analschleimhaut ist nur selten betroffen (3%) (29). Im Allgemeinen zeigen sich hier aber nur geringere Stenosierungen. Die häufigsten Symptome sind Spasmen oder Beeinträchtigungen der Defäkation in Form einer Proktalgie (29).

Neben der Mundschleimhaut ist die Konjunktivalschleimhaut der zweithäufigste Manifestationsort. In annähernd 11-77% zeigen die Augen Veränderungen durch das VP (30). Es beginnt gewöhnlich als unilaterale Konjunktivitis mit starkem Augenbrennen, Fremdkörpergefühl, Photophobie und ausgeprägtem Tränenfluß. Selten sieht der Untersucher Blasen oder Erosionen. Zunächst schreiten die pathologischen Veränderungen langsam fort und haben ungefähr nach 2 Jahren auch das andere Auge befallen (31, 34).

Der destruktive Prozess an den Augen wird hauptsächlich durch die Vernarbung verursacht und beginnt zunächst mit einer Schrumpfung des unteren und dann beider Fornices. Durch die narbenbedingte Verziehung der

Lider folgt die Trichiasis, das Entropium, die Symblepharon- und Pannusbildung und der Krankheitsprozess kann in einer Erblindung enden. Der Krankheitsverlauf vom Beginn der Erkrankung bis zur Blindheit ist sehr individuell (34). Bisher existiert keine einheitliche Stadieneinteilung des Krankheitsbildes. Hilfreich für die Klinik im Hinblick auf die späteren Therapiemaßnahmen ist die Stadieneinteilung des okulären Pemphigoids nach Tauber et al.(Tabelle 1) (32).

Stadium	Klinische Symptomatik
1	Chronische Konjunktivitis mit subepithelialer Fibrose
2	Fornixverkürzung Grad a (0-25%), Grad b (25-50%), Grad c (50-75%), Grad d (>75%)
3	Symblepharonbildung Grad a-d/n; n=Anzahl der Symblephara Keratopathie; Hornhautvaskularisation
4	Keratinisierung der Augenoberfläche, Ankyloblepharon, Endstadium

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung des vernarbenden, okulären Pemphigoids nach Tauber (32).

Interessanterweise sind analoge klinische Veränderungen als Medikamenten-induziertes vernarbendes Pseudopemphigoid unter Einnahme von systemischen als auch Verabreichung von lokalen Medikamenten beschrieben (30).

Histologisch, immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch findet sich bei der Aufarbeitung der Biopsate kein Unterschied zwischen Patienten mit vernarbendem oder Pseudopemphigoid (33). Es ist unklar, ob das Pseudopemphigoid tatsächlich eine Entität darstellt oder ob es sich dabei um ein VP handelt, das durch Medikamenteneinnahme induziert wird bzw.exazerbiert.

Die Schleimhäute des Genitalbereiches werden in 20% der Fälle vom VP betroffen (16, 27).

Die Erscheinungen reichen von Bläschen und Erosionen der Glans penis und der Labia majores und minores bis hin zu Adhäsionen durch fortschreitende

Fibrose mit eventueller Einengung der vaginalen und urethralen Orifizien. Über daraus resultierende sexuelle Dysfunktionen wurde berichtet (35).

### **1.5.2 Hautbefall**

Ein zusätzlicher Befall der Haut findet sich bei ca. 25% der Patienten. Hierbei können vernarbende neben nicht vernarbenden Läsionen auftreten (8, 27).

Erythemosquamöse Plaques des Kappilitiums, des Halses und des Gesichtes können sich zu rezidivierenden Blasen entwickeln, die unter atrophischer Narbenbildung abheilen (8,16). Ein Befall der Kopfhaut führt zu einer vernarbenden Alopezie. Ebenso wurden vesikulo-bullöse Hautveränderungen am Stamm beobachtet, die klinisch identisch mit den Effloreszenzen des bullösen Pemphigoids sind und ohne Narbenbildung abheilen. Auch der Krankheitsverlauf scheint sich bei beiden Formen zu unterscheiden. Während die vernarbende Form zu Rezidiven neigt, aber eher nur lokalisiert auftritt, breitet sich die nicht vernarbende Form oft am gesamten Integument aus, zeigt aber insgesamt eine schnellere Abheilungstendenz (7, 8).

### **1.5.3 Klinische Sonderformen**

#### **1.5.3.1 VP vom Typ Brunsting-Perry**

Eine seltene, allerdings als Entität umstrittene Form des kutanen VP, stellt der Typ Brunsting-Perry dar (36). Hierbei finden sich Effloreszenzen ausschließlich im Bereich des Kappilitiums, des Gesichtes, des Nackens und des oberen Stammbereiches. Männer im höheren Lebensalter sind bevorzugt betroffen. Eine Beteiligung der Schleimhäute wird generell nicht beobachtet (8, 36, 37).

### **1.5.3.2 Paraneoplastisches VP**

Es existieren eine Reihe von Beobachtungen, die das Auftreten eines VP im Rahmen einer zugrundeliegenden Neoplasie beschreiben (38). Klinisch und histologisch entsprechen die beschriebene Fälle einem VP, wobei in einzelnen Fällen eine relative Therapieresistenz auffällt (38). Daneben konnte im Falle eines Magenkarzinoms ein Ansprechen des VP auf eine parallel eingeleitete chirurgische radikale Tumortherapie beobachtet werden. Diese Beobachtung spricht durchaus für ein paraneoplastisches Geschehen (39). In diesem Fall konnte eine direkte Assoziation mit Nachweis von Anti-Laminin 5 Antikörpern im Serum des Patienten und der Produktion von Laminin 5 durch die Magenkarzinomzellen in vitro bewiesen werden. Laminin 5 wird nicht nur in der Haut, sondern auch in der Lunge und im Epithel des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Eine aberrierende Synthese von Laminin 5 aufgrund des neoplastischen Prozesses führt möglicherweise zu einer Induktion einer zellulären Autoimmunantwort und somit zum Entstehen von Veränderungen im Sinne eines VP (38).

Alle bisher in der Literatur beschriebenen Fälle eines paraneoplastischen VP sind Fälle mit Nachweis von Autoantikörpern gegen Laminin 5 (Anti-Epiligrin VP). Es sind bisher Assoziationen mit einem großzelligem Karzinom der Bronchien (38), einem Adenokarzinom der Zunge bei einem HIV-Patienten (40), einem Endometriumkarzinom (41) sowie einem Magenkarzinom (39) beschrieben worden. Nur in den wenigsten Fällen werden die strikten Kriterien einer paraneoplastischen Erkrankung nach Curth (42) erfüllt.

### **1.5.3.3 Vegetierendes VP**

1979 beschrieben Winkelmann und Su einen Patienten mit vegetierenden, pustulösen Hautveränderungen, die klinisch nicht von einem Pemphigus

vegetans unterscheidbar waren, histologisch und immunhistopathologisch aber eindeutig Kriterien eines bullösen Pemphigoids aufwiesen (43).

Wolff et al. berichteten 1987 über einen Fall, der sowohl diese disseminierten vegetierenden und purulenten Hautveränderungen, als auch die Blasen und Schleimhautveränderungen im Sinne eines VP aufwies (44).

Immunhistochemisch fanden sich lineare IgG-Ablagerungen in der direkten Immunfluoreszenz und zirkulierende Anti-Basalmembranantikörpern vom IgG-Typ. Das zugrundeliegende Antigen wurde nicht identifiziert. Auch diese klinische Sonderform unterstreicht den heterogenen Phänotyp des VP, der in den kommenden Jahren aufgrund der Antikörperspezifität vielleicht besser eingeteilt werden kann.

## **1.6 Differentialdiagnose des VP**

Differentialdiagnostisch müssen aufgrund ähnlicher klinischer Effloreszenzen der Lichen ruber bullosus und der Pemphigus vulgaris, die Epidermolysis bullosa acquisita und die IgA-lineare Dermatose in Betracht gezogen werden (7, 8). Eine exakte Diagnosestellung ist nur durch die Kombination von Klinik, Histologie, DIF, IIF, Blasentypisierung mit Typ-4-Kollagen-Antikörpern und eventuell zusätzlich Immunoblotting oder Immunelektronenmikroskopie möglich.

## **1.7 Histologie des VP**

### **1.7.1 Histologie der kutanen Läsionen**

Die histologischen Merkmale des VP werden zumeist als relativ unspezifisch beschrieben (7). Die Hautläsionen des VP sind histologisch oft nicht sicher von solchen des bullösen Pemphigoids oder der Epidermolysis bullosa acquisita zu unterscheiden, insbesondere wenn die beweisende Fibrose oder das Granulationsgewebe der klinischen Vernarbung noch nicht ausgebildet ist (1, 15, 45).

In den frühen Läsionen finden sich histologisch oft eine initiale, schmale, dermo-epidermale Spaltbildung. Die Spaltbildung kann sich durch einströmende Gewebsflüssigkeit und Fibrin zur prallen Blase ausbilden. Das überwiegend perivaskuläre Infiltrat setzt sich aus mononukleären Zellen, eosinophilen und neutrophilen und Plasmazellen zusammen. Die Dichte der Eosinophilenzahl soll etwas weniger ausgeprägt sein als bei dem bullösen Pemphigoid (1).

In älteren Läsionen zeigt sich die Fibrose, die dann klinisch als Vernarbung imponiert und die Diagnose sichert.

Wie beim bullösen Pemphigoid kann auch bei deutlich ausgeprägter Blasenbildung, der Blasenboden des vernarbenden Pemphigoids eine Girlandenform (Festooning) zeigen (1). Dieses Merkmal wird durch den Umriss der erhaltenen dermalen Papillen hervorgerufen. Einschränkend muss angemerkt werden, dass sich dieses Phänomen ebenso bei anderen subepidermalen blasenbildenden Dermatosen wie der Epidermolysis bullosa acquisita und der Porphyria cutanea tarda finden lässt.

### **1.7.2 Histologie der mukösen Läsionen**

Histologisch sieht man bei Schleimhautbiopsien, insbesondere bei oralen Veränderungen, seltener Bläschen. Häufiger findet man Granulationsgewebe oder Fibrose in Kombination mit einer unspezifischen akuten oder chronischen Entzündung aufgrund der sekundären Infektionen. Ein hohe Anzahl von Eosinophilen und entsprechender Klinik sollte den Untersucher an das vernarbende Pemphigoid denken lassen. Das Infiltrat der Schleimhaut kann zusätzlich noch vermehrt Plasmazellen aufweisen. Meist liegt das Infiltrat oberflächlich, kann sich aber auch bis in die Tiefe der Dermis beziehungsweise der Submukosa ausbreiten (1).

Konjunktivale Biopsien zeigen eine epitheliale Metaplasie, ein Infiltrat überwiegend aus Lymphozyten, Plasmazellen und einer erhöhten Rate von Mastzellen (46).

Die Anwesenheit von Eosinophilen in der Mundschleimhaut wird eher als selten angegeben (47, 48).

Insgesamt gilt es zu konstatieren, dass nur wenige größere Studien oder sogar vergleichende Studien zu der Histologie des VP existieren. Auch sind widersprüchliche Angaben nicht selten.

### **1.7.3 Lichenoides VP**

Eine erstmals von M. Megahed genauer untersuchte und beschriebene histologische Variante des VP zeigt sich bei Patienten mit VP der Mundschleimhaut oder des Genitalbereiches. Diese Variante ist charakterisiert durch die subepidermale Spaltbildung oder Blase mit dichtem bandartigem Infiltrat aus Lymphozyten und Plasmazellen, sowie vereinzelt eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Das Epithel ist akantotisch verbreitert und weist Hypergranulose und vakuolige Degeneration der Basalmembranzzone auf (6).

Auch Egan erwähnt in seiner Veröffentlichung, dass die Mundschleimhaut in der oberen Submucosa ein lichenoides Infiltrat aufweisen kann, geht aber auf diese Beobachtung nicht näher ein (49).

## **1.8 Immunhistochemische Befunde**

### **1.8.1 Direkte Immunfluoreszenz (DIF)**

Die Technik der direkten Immunfluoreszenz (DIF) ist unverzichtbarer Bestandteil in der Diagnostik der bullösen Autoimmundermatosen. Korrekterweise wird sie an unfixierten Proben aus periläsionaler oder unbefallener Haut oder Schleimhaut durchgeführt. Für das VP finden sich an Proben von unbefallener Wangenschleimhaut in circa 80%-97% der Fälle lineare Ablagerungen für IgG, C3 und z.T. IgA an der Basalmembranzzone (7, 50-53).

Neben solchen kongruenten Befunden gibt es immer wieder Fälle mit charakteristischen Veränderungen von Augen und Mund im Sinne eines VP, die keine positive Immunfluoreszenz aufweisen (52).

Die Zusammensetzung der Immunglobulinablagerungen entlang der BMZ bestehen im überwiegenden Teil aus IgG und C3. Zusätzliche Immunglobuline der Klasse IgA oder IgM, sowie Fibrin sind zwar nachweisbar, spielen aber eine nur untergeordnete Rolle (7).

In der Salt-split-Technik (siehe 1.8.3) lässt sich die Lokalisation der Immunglobulinablagerungen im Falle der subepidermal blasenbildenden Autoimmunerkrankungen genauer zuordnen (54). Der überwiegende Anteil der gebundenen Antikörper bindet an Strukturen der epidermalen Seite des Spaltes. Vereinzelt findet sich ein gemischtes Bindungsmuster an Blasenboden und -dach. Dies korreliert gut mit der Lokalisation der nachgewiesenen Antigene im Falle des VP, die vor allem der Lamina lucida zuzuordnen sind.

### **1.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)**

Zirkulierende Antikörper der IgG-Klasse wurden erstmalig von Dantzig et al. beim vernarbenden Pemphigoid beschrieben (55). In nachfolgenden Untersuchungen anderer Autoren konnten in 10-36% der Patienten mit vernarbendem Pemphigoid zirkulierende Antikörper vom IgG-Typ gegen Strukturen der BMZ nachgewiesen werden (7, 8). Die Titer dieser zirkulierenden Antikörper waren aber meist niedrig.

Wird kochsalzseparierte menschliche Haut als Antigen substrat genommen, gelingt der Antikörpernachweis in einem höheren Prozentsatz (56, 57, 58). Analog dem bullösen Pemphigoid, scheint es eine Korrelation zwischen der Anwesenheit oder der Titerhöhe der Antikörper und der Schwere oder dem Verlauf der Erkrankung zu geben (69).

### **1.8.3 Salt-Split-Technik**

Die Salt-Split-Technik (SST) dient der Verfeinerung des Antigenmappings in der Immunfluoreszenztechnologie. Hierbei wird in einer Probiopsie aus unbefallener oder befallener Haut oder Schleimhaut durch die Inkubation des Gewebes in einmolarer Kochsalzlösung eine artifizielle Spaltbildung innerhalb der Lamina lucida der BMZ induziert (59). In der nachfolgenden DIF oder IIF kann dann an einem so vorbehandelten Haut- oder Schleimhautexzidat der in vivo gebundene Autoantikörper genauer seiner originären Bindungsstelle entsprechend einem epidermalen, dermalen oder gemischten Muster zugeordnet werden (59).

Anhand der SST wird eine Abgrenzung zwischen BP und EBA erst möglich. Hinsichtlich der sicheren Abgrenzung des VP zu dem BP oder der EBA versagt

diese Methode leider häufig, da im Falle des VP epidermale, dermale oder Ablagerungen vom gemischten Typ vorkommen können und so eine sichere Zuordnung nicht möglich machen (58, 60).

## **1.9 Elektronenmikroskopische Befunde**

Das ultrastrukturelle Bild des vernarbenden Pemphigoids ist charakterisiert durch eine Spaltbildung im Bereich der Lamina lucida (46, 48, 61). Einige Untersuchungen an Schleimhaut- sowie Hautproben des VP können eine intakte, nicht alterierte BMZ am Bereich des Blasenbodens nachweisen (61). Andere Autoren finden hingegen Zeichen einer deutlichen Alteration und Beschädigung der BMZ, wie dies auch für das BP bekannt ist. (46, 62)

### **1.9.1 Immunelektronenmikroskopie**

Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen mittels der Immunogold-Methode zeigen ein heterogenes Muster von Immunglobulinablagerungen. Eine Gruppe von Patienten zeigt Ablagerungen an der epidermalen Seite im Bereich der Hemidesmosomen, eine andere im Bereich des Überganges der Lamina lucida zur Lamina densa, somit auf der dermalen Seite (63). Dies könnte durchaus mit dem heterogenen Autoantikörper gegen verschiedene Zielproteine ( z.B. BPAg2 und Laminin 5) korrelieren.

## **1.10 Ätiologie und Pathogenese des VP**

Zum besseren Verständnis der komplexen pathologischen Mechanismen, die bei bullösen Autoimmunerkrankungen von pathogenetischer Relevanz sind, ist es wichtig, den Aufbau der humanen BMZ in Struktur und Funktion zu kennen. Abbildung 2 zeigt schematisch die Struktur der BMZ und der an ihrem Aufbau

beteiligten Strukturproteine und deren relative Lage zueinander. Nachfolgend werden die einzelnen Strukturproteine der BMZ charakterisiert und ihre Relevanz in der Pathogenese des VP besprochen.

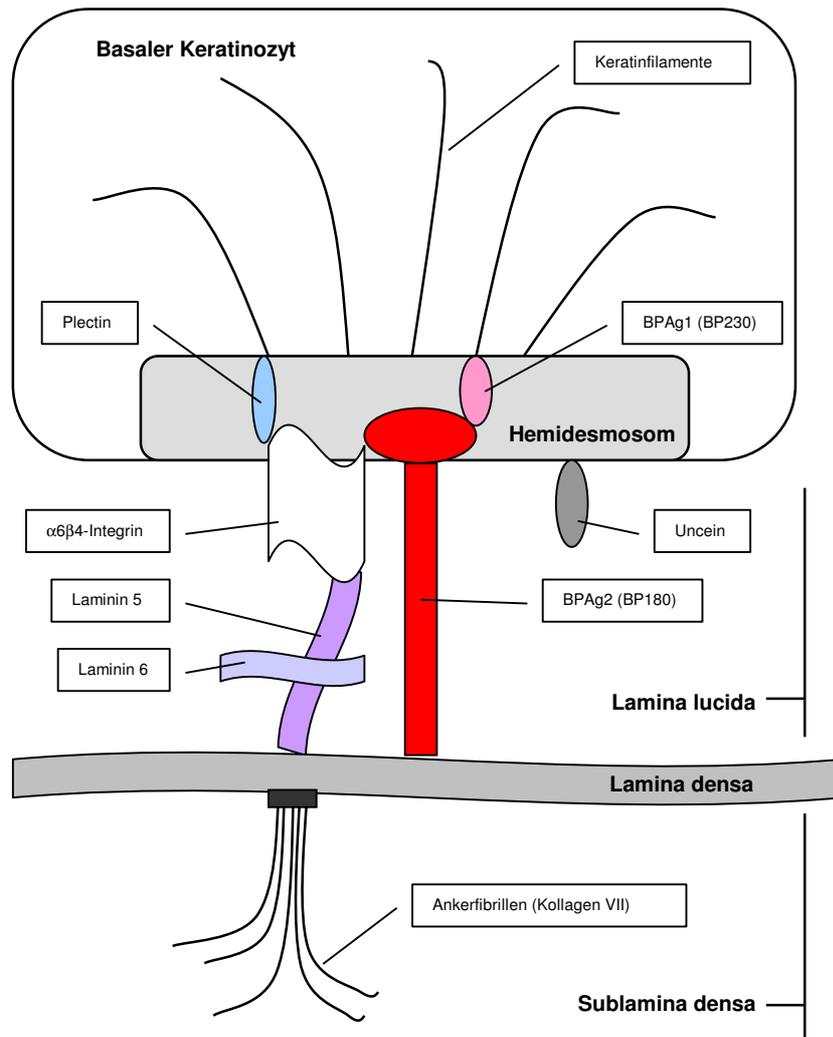


Abbildung 2: Dermo-epidermale Junctionszone mit schematischer Darstellung der bisher charakterisierten, involvierten Proteine. (6)

### **1.10.1 Hemidesmosomen**

An der Unterseite der basalen Keratinozyten gelegen, enthalten die Hemidesmosomen die Struktur von Desmosomen mit einzelnen intrazytoplasmatischen Befestigungsplaques an denen die Tonofilamente der basalen Keratinozyten inserieren (66). Das BP230 (BPAg1) liegt an der intrazellulären Seite der Hemidesmosomen, wohingegen das BP180 (BPAg2) ein transmembranöses Protein ist, das eine intrazelluläre Domäne, ein transmembranöses Segment und eine extrazelluläre Domäne, die in die Lamina lucida ragt, besitzt (66, 71, 80). Die extrazelluläre Domäne des BP180 Proteins enthält eine Kollagendomäne, die durch 16 nicht-kollagene Domänen unterbrochen wird. Die größte der letztgenannten Domänen, NC16 a, grenzt an das transmembranöse Segment. Andere bekannte hemidesmosomale Proteine sind Plektin (ein zytoskelettassoziiertes Befestigungsprotein) und  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin (2, 64, 65, 66).

### **1.10.2 Lamina lucida**

Zwischen den Hemidesmosomen und der Lamina densa gelegen, ist die Lamina lucida ein 44-55 nm breiter elektronenmikroskopisch heller Streifen. Allerdings werden feine fadenförmige Strukturen innerhalb dieser Zone beobachtet, die den sogenannten Ankerfilamenten entsprechen. Diese Ankerfilamente ziehen von den Hemidesmosomen der basalen Keratinozyten zur Lamina densa und durchziehen somit die Lamina lucida. Diese Ankerfilamente bestehen hauptsächlich aus den Proteinen Laminin 5, 6 und 10 (64-66).

Laminin-5 ist ein heterotrimeres Protein, das aus drei Ketten, nämlich aus dem  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Segment zusammengesetzt ist. Laminin 5 besteht aus den Ketten  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ . Frühere Namen für Laminin 5 waren Lalinin, Epiligin, Nicein und BM600. Sezerniert wird Laminin 5 durch die Keratinozyten (60, 66).

Laminin 6 ist ebenfalls eine Lamininvariante und wurde vorher  $\kappa$ -Laminin genannt. Laminin 6, ein Heterotrimer aus  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ -Ketten wird durch epidermale Zellen produziert und teilt strukturelle sowie immunologische Ähnlichkeiten mit zwei anderen in der Lamina lucida lokalisierten Laminine, dem Laminin1 ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ ) und 5 ( $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ ) (65-66).

### **1.10.3 Lamina densa**

Die Lamina densa wird elektronenmikroskopisch durch eine elektronendichte Zone von 35-45nm Dicke zugeordnet. Diese Struktur enthält Typ-IV-Kollagen, Perlecan und Nidogen (Entactin). Typ-IV-Kollagen wird als die Hauptkomponente dieser Zone angesehen (2, 64).

### **1.10.4 Sub-Lamina densa**

Die Sub-Lamina-densa liegt unterhalb der Lamina densa und verbindet diese durch fibrilläre Fasern (anchoring fibrils) mit der Dermis. Diese Ankerfibrillen bestehen hauptsächlich aus Kollagen-VII, das sowohl von Keratinozyten als auch von Fibroblasten produziert wird (2, 67).

### **1.10.5 Hypothetische pathogenetische Prozesse des VP**

Bis jetzt ist der exakte Pathomechanismus des VP nicht eindeutig geklärt. Verschiedene pathogenetische Faktoren des VP konnten bestimmt und überprüft werden. Das exakte Zusammenspiel dieser Faktoren ist jedoch unzureichend geklärt.

Der Fokus liegt zunächst auf Autoantikörpern gegen Komponenten der BMZ. Daneben gibt es pathogenetisch relevante Hinweise auf immungenetische

Veranlagungen (HLA-Muster) und Mechanismen des „epitope-spreadings“, d.h. dem Demaskieren von immunogenen Strukturen durch vorangehende entzündliche Prozesse und Induktion einer Autoimmunreaktion. Die Rolle der Zytokine und der zellulären Immunantwort in der Ausprägung des zur Vernarbung führenden Prozesses ist ebenfalls noch nicht geklärt (19).

Als initialer Prozeß kann eine Veränderung des entsprechenden Autoantigens der BMZ angenommen werden, das nun einen Antigen-Stimulus darstellt und eine Immunantwort initiiert. Es erfolgt eine Induktion einer Autoantikörperbildung durch Stimulierung von pathogenen B-Zell-Klonen, die ihrerseits Antibasalmembran-Antikörper produzieren und sezernieren (68).

Nach Bindung der pathogenen Antibasalmembranantikörper an ihre Zielantigene in der Lamina lucida erfolgt eine Komplementaktivierung und Aktivierung der Entzündungskaskade mit Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren (68, 70). Es folgt eine autokrine Stimulation der Entzündungszellen, wie Lymphozyten, Eosinophilen, Neutrophilen und der Mastzellen in die Basalmembranzzone. Der Entzündungsprozess mit Freisetzung proteolytischer Enzyme und Zytokinen führt zur Funktionstörung oder Destruktion der beteiligten Strukturproteine der BMZ und somit zum Kohärenzverlust, der mit der Trennung von Epidermis und Dermis einhergeht. Klinisches Korrelat stellt die Blasenbildung dar (3, 4, 19, 65, 68).

Bisher konnten bei Patienten mit VP überwiegend Autoantikörper gegen das BPAg-2 und gegen Laminin5 festgestellt werden (3, 65). Im Unterschied zu Patienten mit bullösem Pemphigoid binden diese AK aus Seren von VP Patienten allerdings an einer anderen Bindungsstelle des BPAg2, nämlich am Carboxylende des Proteins im Bereich des Kontaktes zwischen Lamina lucida und densa (71). Dies könnte auch eine Erklärung für die Vernarbungstendenz bei Patienten mit VP im Gegensatz zu denen mit BP sein (72). Auch die Bindungsstelle der Autoantikörper gegen Laminin 5 liegt relativ tief in der BMZ in direkter Nähe zu dem Carboxylende des BPAg-2 (49).

Aufgrund des Nachweises weiterer Autoantikörper gegen andere Zielstrukturen der BMZ ist es sehr wahrscheinlich, dass die klinische Entität des VP immunologisch durchaus heterogener ist als bisher vermutet. Bisher konnten AK gegen folgende Proteine der BMZ bei Patienten mit VP nachgewiesen werden: BPAg2 (71, 72), Laminin 5 (60), Laminin 6 (73), Uncein (74),  $\alpha 6\beta 4$  Integrin (75) sowie bisher nicht näher charakterisierte Proteine folgender Größe: ein 45 kD Keratin, ein 168 kD Antigen und ein 205 kD Antigen mit hoher Homologie zu dem  $\beta 4$ -Integrin, ein 120 kD Protein im Bereich der Ankerfilamente sowie zwei 280 kD und 265 kD große Polypeptide (65).

Die dermoepidermale Spaltbildung mit dem Kohärenzverlust im Bereich der BMZ ist ein Resultat der Antikörperbindung und der nachfolgenden direkten zytotoxischen Aktivität der Leukozyten und ihrer lysosomalen proteolytischen Enzyme (68). Im Gegensatz zum BP heilt das VP mit Narbenbildung ab. Die Induktion dieses fibrotischen Prozesses und die ausschlaggebenden Faktoren, die zu diesem Phänomen führen, sind letztlich noch nicht eindeutig geklärt. Neben der Lokalisation der Autoantigene in Bezug zu der BMZ werden auch Unterschiede in der Induktion der Fibroblastenaktivität durch nachfolgende Entzündungsgeschehen diskutiert (76).

Alle Proteine, denen vermutlich eine pathogene Bedeutung bei der Entstehung des VP zukommt, sind Bestandteile der Lamina lucida und übernehmen eine wichtige funktionelle Rolle für die Adhäsion zwischen Epidermis und Dermis. Diese Adhäsion besteht aus den epidermalen Hemidesmosomen, den Epidermis und Dermis verbindenden Ankerfilamenten in der Lamina lucida und den Ankerfibrillen auf der dermalen Seite (2). Im Hinblick auf dieses hochkomplexe Zusammenspiel der Proteine der Basalmembranzzone und deren unmittelbare räumliche Anordnung, verwundert es nicht, dass Autoantikörperbindung gegen verschiedene Antigene der BMZ zu einem nahezu identischen klinischen Krankheitsbild führen kann.

Ob die Antikörperbindung allein, analog dem Pemphigus vulgaris (77), eine Blasenbildung induziert oder ob es weiterer entzündlicher Prozesse bedarf, ist im Rahmen des VP nicht zu beantworten. Es werden hier zwei Wege diskutiert.

Zum einen vermag direkt die Antigen–Antikörperbindung zur Funktionsstörung des entsprechenden Moleküls und somit zur Spaltbildung zwischen Epidermis und Dermis führen. Dieser Pathomechanismus wurde mittels passiven Transfers von Ak auf komplementdefiziente Mäuse für Patienten mit Autoantikörper gegen Laminin 5 nachgewiesen werden (78). Die Antikörper als auch reine Fab-Fragmente konnten selbst in immundefizienten Mäusen eine Blasenbildung induzieren. Dies unterstreicht die Möglichkeit der Blasenbildung in der akuten Phase des VP durch den Antikörper alleine ohne Involvierung der entzündlichen Kaskade des Immunsystems, der T-Zellen oder der Mastzellen. Der chronisch entzündliche Prozeß mit der Induktion der Fibrose bedarf allerdings der entzündlichen Folgereaktionen.

Zum anderen erfolgt erst durch die Antikörperbindung eine Aktivierung des Komplementsystems mit anschließender inflammatorischer Gewebereaktion. Mit Einwanderung von Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten werden proteolytische Enzyme freigesetzt, die eine Spaltbildung verursachen (76). Dieser komplementabhängige Weg konnte für Patienten mit AK gegen BPAg2 nachgewiesen werden (79).

#### **1.10.6 Zielantigene des VP**

Eine Übersicht der bis dato nachgewiesenen Zielantigene im Rahmen des VP folgt in dem folgenden Abschnitt.

### 1.10.6.1 BPAg2 (BP180)

Das bestcharakterisierte Antigen stellt das BPAg2 (BP180) dar, an das Antikörper von Patienten mit bullösem Pemphigoid, Herpes gestationes und auch vernarbendem Pemphigoid binden (65). Es existieren zwei unterschiedliche Bindungsstellen an der extrazellulären Domäne von BP180 (72). Eine stellt die non-collagenous NC16A Domäne, die andere die terminale Carboxyl-Gruppe des Proteins dar (Abbildung 3). Patienten mit BP binden an das eher epidermal gelagerte NC16a Epitop, Patienten mit VP überwiegend an den dermal lokalisierten COOH-Terminus (71). Das BP180-Antigen kann sowohl in epidermalen Hautkeratinozyten als auch in kultivierten Keratinozytenextrakten nachgewiesen werden und hat ein Molekulargewicht von 180 kD (80).

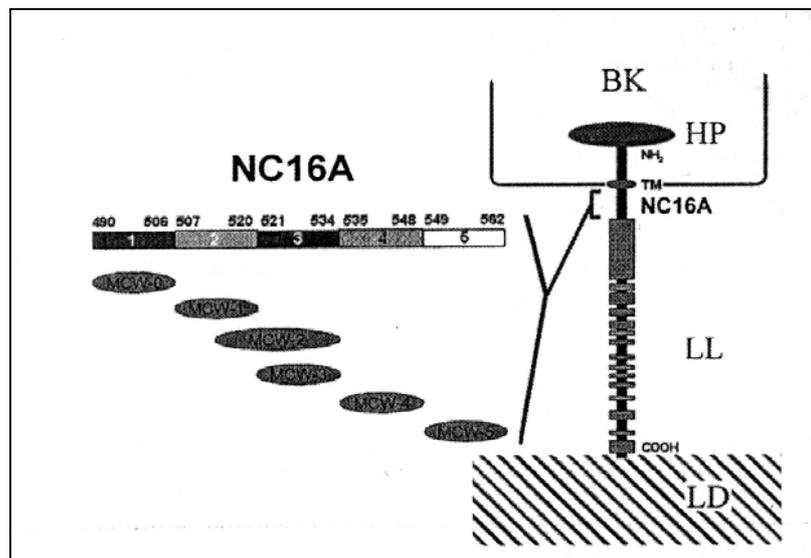


Abb. 3: Das BPAg2 mit Darstellung der NC16A Domain (BK: basaler Keratinozyt, LL: Lamina lucida, LD: Lamina densa) (71,80)

Ultrastrukturell befindet sich das BPAg2 unterhalb der Hemidesmosomen in der Lamina lucida und im oberen Anteil der Lamina densa (71).

In einer Studie von Balding reagierten 70% (16/23) der Sera von Patienten mit VP mit einer oder mit beiden zuvor genannten Untergruppen (81). Murakami et al. konnte an 50 Patienten mit VP IgG- Antikörper gegen BP180 in 30% der Fälle und IgA Antikörper in 22% nachweisen (57).

Es ist naheliegend, unterschiedliche Bindungsverhalten der AK bei Patienten mit BP und VP an dem BPAg2 mit der klinisch unterschiedlichen Vernarbungstendenz in Verbindung zu bringen. Dass nicht nur die Nähe zur Lamina densa des C-terminalen Epitopes des BPAg2 hierfür verantwortlich sein kann, wird durch eine Studie von Nakatani et al. belegt. In dieser größeren Studie (n=110) verglich man das Vorkommen von Antikörpern gegen das C-terminale Ende (23,5%) und dem NC16a-Epitop (91%) mit den klinischen Symptomen Vernarbung und Schleimhautbefall und konnte keinen Unterschied feststellen (82).

#### **1.10.6.2 Laminin 5 und Laminin 6**

Erstmals wurde Laminin 5 als Strukturprotein der BMZ 1992 von Domloge-Hultsch mit dem vernarbenden Pemphigoid in Verbindung gebracht (60). Bis heute sind etwa 20 Patienten mit Laminin 5 Antikörpern und VP beschrieben worden (65).

Laminin 5 ist eine Lamininvariante, die aus 3 Ketten besteht ( $\alpha 3$ ,  $\beta 3$   $\gamma 2$ ), die kreuzförmig angeordnet sind. Laminin 5 teilt sich Homologien mit Laminin 6, einem Heterotrimer aus  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ , das ebenfalls in der Basalmembran zu finden ist. Laminin 5 verbindet die basalen Keratinozyten mit der darunterliegenden Dermis. Die Verbindung wird über das hemidesmosomale Adhäsionsmolekül  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin auf der epidermalen Seite und Kollagen Typ VII (Hauptbestandteil der Ankerfibrillen) auf der dermalen Seite hergestellt (83-85).

Eine Untergruppe von Patienten mit vernarbendem Pemphigoid bilden Antikörper gegen die alpha-Kette von Laminin 5 und somit auch gegen Laminin 6 (60, 73). Welches Ende der  $\alpha$ 3-Kette die Antikörper bindet, ist bisher noch nicht untersucht worden.

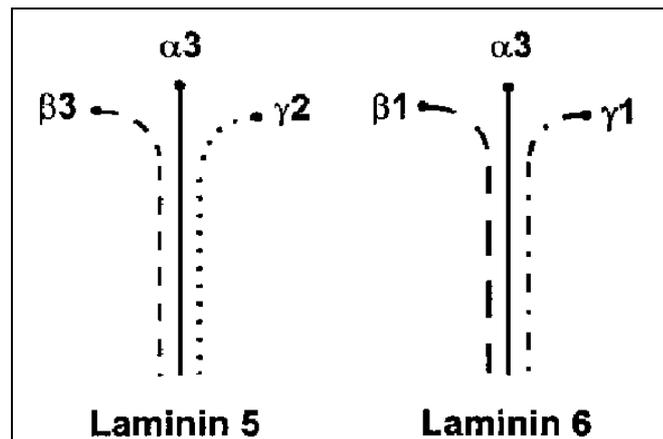


Abb. 4: Schematische Darstellung von Laminin 5 und Laminin 6 (83-85)

Weiterhin wurde gezeigt, dass Laminin 5 oder der Laminin5/6 Komplex an die NC 1 Domäne von Kollagen Typ VII bindet. Damit wird zusätzlich die wichtige Rolle der beiden Proteine hinsichtlich der epidermalen/dermalen Adhäsion unterstrichen (66).

Die pathogenetische Relevanz von anti-Laminin 5 Antikörpern wurde im neonatalen Mausmodell gezeigt. Wenn man neugeborenen Mäusen Anti-laminin 5 Antikörper injiziert, entwickeln die Tiere eine subepidermale blasenbildende Dermatose, die klinisch dem anti-Epiligrin-Pemphigoid entspricht (78).

Die Antikörper gegen Laminin 5 binden an der dermalen Seite durch SSS-Technik gespaltener Haut. Elektronenmikroskopisch ist es in der Lamina lucida und oberen Lamina densa lokalisiert (63).

Autoantikörper gegen Laminin 6 wurden bei Patienten mit VP von Chan et al. und Lazarova et al. beschrieben (73, 78).

Laminin 6 wird in der epidermalen Basalmembranzzone gefunden und ist eine Lamininvariante, deren  $\alpha$ -Kette mit der von Laminin 5 identisch ist. Die pathogenetische Bedeutung der Anti-Laminin 6 Antikörper ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass die Antigen-Antikörper-Bindung an der  $\alpha 3$  Untereinheit beim Antiepileptin-Pemphigoid die Funktion des Laminin5/6 Komplexes stört.

### **1.10.6.3 $\alpha 6\beta 4$ Integrin**

Ein weiteres potentiell Zielantigen stellt das hemidesmosomale  $\alpha 6\beta 4$  Integrin dar, das bei einigen Patienten mit okulärem und oralen VP gefunden werden konnte (86, 87). Es handelt sich um ein Protein, das aus zwei Untereinheiten, der  $\beta 4$  Kette (205 kD) und der  $\alpha 6$  Kette (120 kD), besteht. Auf cytoplasmatischer Seite interagiert die  $\beta 4$  Einheit mit dem hemidesmosomalen Plectin und dem BPAg2 (88).

Antikörper gegen die  $\beta 4$  und  $\alpha 6$  Untereinheiten konnten bei Patienten mit VP nachgewiesen werden. Interessanterweise scheinen Patienten mit okulärem VP Ak gegen die  $\beta 4$  Einheit, Patienten mit enoralem VP gegen die  $\alpha 6$  Einheit zu bilden (86, 87). Inwieweit diese bisherigen Ergebnisse reproduzierbar sind, bleibt offen. Die Relevanz der Ergebnisse wird durch den Nachweis der Fähigkeit einer BMZ Separation durch  $\beta 4$  Antikörper in vitro zu induzieren unterstrichen (89).

In der indirekten Immunfluoreszenz binden die Antikörper an der epidermalen Seite der Blase bei der durch SSS-Technik gespaltenen Haut. Die pathogenetische Relevanz wurde bis jetzt noch nicht in einem experimentellen Tiermodell bewiesen.

#### **1.10.6.4 Weitere potentielle Zielantigene des VP**

Über ein 168-kD Protein in der Mundschleimhaut als Zielantigen bei 6 Patienten mit VP wurde von Ghostani et al berichtet (75). An der durch SSS-Technik gespaltenen Haut lokalisierten sich die Antikörper an der epidermalen Seite. Laut der Autoren ließ sich dieses Protein besser in Extrakten der Mundschleimhaut nachweisen als in Hautextrakten (75). Allerdings wird vermutet, dass es sich hierbei um die  $\alpha 6$ -Untereinheit des  $\alpha 6\beta 4$  Integrins handelt (65). Hierfür sprechen auch die Arbeiten von Bohl, die die relative Spezifität der Ak gegen  $\alpha 6$  für das enorale VP beweisen (87).

Ein weiteres Polypeptid, das bei Patienten mit vernarbendem okulärem Pemphigoid beschrieben wurde, hat ein Molekulargewicht von 45 kD. Hierbei wurden IgA-Antikörper gefunden, die an der epidermalen Seite der durch SSS-Technik gespaltenen Haut binden. Eventuell handelt es um ein Peptid eines größeren Moleküls. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um ein Keratin (90).

Des Weiteren wurde eine erworbene bullöse Dermatose aufgrund einer Autoimmunreaktion auf das Lamina lucida Protein Uncein beschrieben (74). Uncein ist zusammengesetzt aus drei Ketten mit einem Molekulargewicht von 100, 130 und 165 kD. Dieses Muster erinnert sehr an den Aufbau von Laminin 5. Auch biochemisch weist Uncein Gemeinsamkeiten mit Laminin 5 auf und ist an den Ankerfilamenten in der Lamina lucida lokalisiert (91).

Von Bhol et al. wurde 1996 und 1997 über Patienten mit vernarbenden enoralen Pemphigoid berichtet, bei denen Antikörper gegen ein 60-70 kD schweres, bisher unidentifiziertes Molekül nachgewiesen werden konnten. Auch hier wird aufgrund von Komigrationsuntersuchungen vermutet, dass es sich um die  $\alpha 6$ -Untereinheit von  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin handelt (92).

#### **1.10.7 Die Rolle des Entzündungsgeschehens in der Pathogenese des VP**

Dass die Bindung der oben beschriebenen Autoantikörper an die entsprechenden Zielstrukturen in der BMZ einen Kohärenzverlust zwischen Epidermis und Dermis zu induzieren in der Lage sind, ist unumstritten. Inwieweit allerdings die nachfolgenden entzündlichen Reaktionen verantwortlich für die klinische Ausprägung und den Verlauf des VP sind, ist nach wie vor nur teilweise bekannt (68). Diese entzündliche Folgereaktion erfolgt zunächst über die Bindung und Aktivierung von Komplementfaktoren. Diese induziert nun die Einwanderung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und somit deren Freisetzung proteolytischer Enzyme.

Beim bullösen Pemphigoid werden histologisch eosinophile Granulozyten im Infiltrat nachgewiesen (1,6). Die Sezernierung der proteolytischen Enzyme der Eosinophilen in die Lamina lucida beim BP konnte in elektronenmikroskopischen und immunhistochemischen Untersuchungen nachgewiesen werden und scheint eine zentrale Bedeutung für die Krankheitsaktivität zu haben (93, 94).

Die Histologien des VP, insbesondere des okulären VP, zeigen eine geringere ausgeprägte Eosinophilie (1, 6). Nur in der akuten Phase des okulären VP konnte von Heiligenhaus Eosinophile und deren granuläre Proteine nachgewiesen werden, sie scheinen aber gerade hier die Krankheitsaktivität und somit die Vernarbung zu mediieren (95). Mastzellen sind in Biopsien von OCP Patienten ebenfalls signifikant erhöht (100).

Die Bedeutung der Eosinophilen an der Entstehung einer Fibrose wird durch eine Reihe von Beobachtungen aus dem Bereich der Kollagenosen unterstrichen (96). Analog der systemischen Sklerodermie und der eosinophilen Fasziitis korrelieren Eosinophilenzahl und deren Degranulation mit konsekutiv erhöhtem Level der eosinophilen Proteine (ECP, MBP) mit dem Fibrosegrad der Kollagenosen (95, 97). Hierbei scheint der Induktion der Expression des transforming growth factors (TGF) durch die eosinophilen Granulozyten eine nicht unerhebliche Rolle in der Wirkung auf den Gewebsfibroblasten zuzukommen.

Im Falle des akuten, okulären VP konnte TGF beta1 und 3 deutlich erhöht gemessen werden. Im chronischen Stadium zeigen sich die Werte vollkommen normal (98). Auch in dermalen Fibroblasten von Patienten mit VP konnte eine Hochregulation der Expression von TGF beta1, Heat shock protein 47 und Typ I und III Kollagen objektiviert werden (99). Diese Proteine sind zentraler Bestandteil der Prozesse, die zu einer Fibrose führen. Daneben konnten bisher erhöhte Level von IL-10, IL-4, IL-5 und mCSF in Biopsien, bzw. in der Blasenflüssigkeit nachgewiesen werden. Dies spricht für ein TH-2 ähnliches Zytokinmuster (101-104).

### **1.11 Klinischer Verlauf und Therapie des VP**

Die Therapie des VP ist problematisch. Die Krankheitsverlauf ist schubweise und hochchronisch. Bei Diagnosestellung befindet sich die Erkrankung meist in einem fortgeschrittenen Stadium. Das therapeutische Grundprinzip besteht in der Unterbindung der Entzündungsreaktion und konsekutiven Fibrosierung des betroffenen Organs.

Insbesondere bei Befall der konjunktivalen Schleimhaut gestaltet sich die Therapie als äußerst schwierig. Nicht nur aufgrund der starken Beeinträchtigung des Sehvermögens und der damit verbundenen

Einschränkung der Lebensqualität der Patienten im Vollbild des VP stellt sich die Frage nach einer zeitgerechten und stadiengerechten Therapie. Bereits die Frage, wann die Einleitung einer immunsuppressiven Behandlung sinnvoll ist, kann aufgrund der langen Ruhephasen der Erkrankung in den Stadien I und II nach Forster oftmals nicht genau entschieden werden, da auch die mit der Therapie verbundene Risiken und Nebenwirkung mit in das therapeutische Vorgehen einbezogen werden müssen. Auch die Beurteilungskriterien für den Verlauf der Erkrankung und somit für das Ansprechen eines Therapieverfahrens können Schwierigkeiten bereiten, da sich Veränderungen sehr langsam und diskret zeigen. Dieser Verlauf macht die Beurteilung jeglicher Art von Therapie schwierig und erfordert eine sehr genaue Dokumentation (6, 7, 19, 105).

Die therapeutischen Möglichkeiten reichen von externen, intraläsionalen, systemischen immunsuppressiven Therapien bis hin zu chirurgischen Behandlungsmethoden (Tabelle 2). Bei alleinigem Befall der enoralen Schleimhaut reichen oft lokale Glukokortikoide in Kombination mit antiseptischen Mundspüllösungen aus. Auch über lokale Anwendung von Cyclosporin wurde berichtet. Bei Augenbefall ist immer eine adjuvante lokale Therapie hinsichtlich des Tränenersatzes und aufgrund der Gefahr einer sekundären Superinfektion notwendig. Bei den meisten Patienten wird aber im weiteren Krankheitsverlauf neben einer lokalen auch eine systemische Therapie erforderlich (105-109).

Bei leichten bis mäßig entzündeten Haut- und Schleimhautläsionen kann zunächst eine Therapie mit DADPS eingeleitet werden. Im Fall des okulären VP reicht die antiinflammatorische Wirkung allerdings oft nicht aus. In den meisten Fällen müssen systemische Glukokortikoide eingesetzt werden. Dabei sind die Nebenwirkungen bei den meist älteren Patienten aufgrund der Langzeittherapie als problematisch einzustufen.

Eine Reduktion der systemischen Glukokortikoiddosis wird durch Kombinationstherapien erreicht. Es existieren hierfür verschiedene Schemata

mit Einsatz von Mycophenolatmofetil, Azathioprin, Leflunomid, Cyclosporin A, Tetrazyklinen, Sulfonen oder Cyclophosphamid (107, 109).

Die am häufigsten angewandte systemische Therapie stellt die Cyclophosphamid/Dexamethason-Kombination dar. Zillikens berichtet über 6 Patienten, bei denen es trotz Therapie bei drei von vier Patienten mit okulärem Pemphigoid zum Befall des anderen, gesunden Auges kam (108).

Neuere Therapieansätze untersuchen zur Zeit die therapeutische Potenz der neueren Immunsuppressiva wie Leflunomid, Mycophenolatmofetil oder FK 506 (107, 109).

<b>Lokalthapeutika</b>
Glucokortikoide (Lutschtabletten, Lösungen, Haftgel, intraläsionale Injektionen)
Wasserstoffperoxid
Diphenhydraminlösung
Antibiotika
Cyclosporin A
FK 506
Mitomycin C

<b>Systemische Therapeutika</b>
DADPS
Kortikosteroide (Puls-oder kontinuierliche Therapie);
Azathioprin
Cyclophosphamid (Puls-oder kontinuierliche Therapie)
Cyclosporin A
Antibiotika
Niacinamid
Sulfasalazin
Mycophenolatmofetil
Leflunomid

Tabelle 2: Therapeutische Optionen in der Behandlung des VP

## 2. Fragestellung

Es existieren bisher nur wenige Arbeiten mit größeren Fallzahlen, die die histologischen Charakteristika des vernarbenden Schleimhautpemphigoids (VP) als zentralen Untersuchungsgegenstand haben. Des Weiteren fehlen vergleichende klinische und histologische Untersuchungen bei Befall *verschiedener* Schleimhautregionen. Weder existieren bisher Untersuchungen über die Blasentypisierung mit Kollagen-Typ-IV-Antikörpern, noch ist die bisher in Einzelfällen beschriebene Variante eines lichenoiden VP histologisch und klinisch exakt definiert worden. Ziel dieser Arbeit soll es sein, neben einer ausführlichen Darstellung der klinischen Bandbreite des VP unter Einschluss der lichenoiden Variante, histologische Grundmuster des vernarbenden Schleimhautpemphigoides zu charakterisieren. Insbesondere sollen folgende Punkte näher bearbeitet werden:

- Finden sich unterschiedliche histologische Grundmuster bei Befall verschiedener Schleimhautregionen?
- Lassen sich bestimmte histologische Grundmuster entsprechend klinischer Merkmale oder Stadien der Erkrankung charakterisieren?
- Inwieweit stehen histologische oder klinische Befunde in Beziehung zu den Ergebnissen der direkten oder indirekten Immunfluoreszenz? Darstellung eigener direkter und indirekter Immunfluoreszenzuntersuchungen unter Berücksichtigung der in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse, sowie unter Beachtung der Lokalisation und einer eventuell vorhandenen diagnostischer Relevanz.
- Was für Befunde lassen sich bei der Blasentypisierung mit Kollagen-Typ-IV-Antikörpern im Falle des VP erheben, und bietet diese eine neue, zusätzliche diagnostische Relevanz?

### **3. Patientenkollektiv**

Die vorliegenden histopathologischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen umfasst ein Kollektiv von 25 Patienten, die in den Jahren 1994-2000 in der Hautklinik der Universität Düsseldorf behandelt und/oder konsiliarisch durch die Augen- oder Zahnklinik der Heinrich-Heine Universität betreut und mitdiagnostiziert wurden. Die beschriebenen Fälle wurden retrospektiv ausgewertet und bearbeitet.

Eingeschlossen wurden alle Patienten, bei denen zweifelsfrei die Diagnose eines vernarbenden Pemphigoids anhand der klinischen, histologischen und immunhistologischen Befunde gestellt werden konnte. Alle fraglichen Fälle oder Fälle ohne ausreichende Dokumentation wurden ausgeschlossen.

Waren die klinischen Veränderungen des vernarbenden Pemphigoids mit IgA-Ablagerungen an der BMZ in den immunhistologischen Untersuchungen vergesellschaftet, wurden die Patienten ebenfalls nicht berücksichtigt und wurden nach der Klassifikation nach Megahed unter Lineare-IgA-Dermatosen eingeordnet(6).

Es wurden die klinischen Akten, die fotografischen Dokumentationen und histologischen Präparate gesammelt und ausgewertet. Im Verlauf der Untersuchung wurden von den in laufender Betreuung befindlichen Patienten neue Fotodokumentationen angefertigt. Wenn notwendig, wurden histologische Präparate aus vorhandenen Gewebeproben neu angefertigt und gefärbt.

## **4. Beschreibung der verwendeten Materialien, Methoden und Geräte**

### **4.1 Herstellung der histologischen Präparate**

Das für die histopathologische Untersuchung herangezogene biopsische Material wurde dem Patienten in Lokalanästhesie als Stanzbiopsie oder spindelförmige Exzision entnommen. Die anschließende Gewebefixierung erfolgte in gepuffertem 4%igem Formalin für die lichtmikroskopischen Untersuchungen, für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde das gewonnene Gewebe über flüssigen Stickstoff eingeforen. Um gleichmäßiges Einfrieren der erfolgten Biopsie zu gewährleisten und das Schneiden zu erleichtern, wurde das Biopsat in ein Einbettmedium (Paraffin) gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zum Anfertigen von Schnitten wurde die Biopsie bei  $-80^{\circ}$  Celsius gelagert.

Die 4  $\mu\text{m}$  dünnen Paraffinschnitte wurden im folgenden entparaffiniert und mit Harris Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Danach schloss sich eine Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe an, es wurde anschließend mit Xylol geklärt und die Präparate eingedeckt. Anschließend erfolgte die mikroskopische Begutachtung.

## 4.2 Die histologische Begutachtung

Die histologische Begutachtung und Auswertung der Schnittpräparate erfolgte nach folgenden qualitativen und semiquantitativen Parametern (Abb. 5):

- Vakuolige Degeneration der Basalzellschicht
- Subepidermale Spalt- bzw. Blasenbildung
- Infiltratverteilung/-muster
- Infiltrattypisierung :
  - Eosinophile Granulozyten (semiquantitativ )
  - Neutrophile Granulozyten (semiquantitativ)
  - Lymphozyten (semiquantitativ)
  - Plasmazellen
- Fibrose

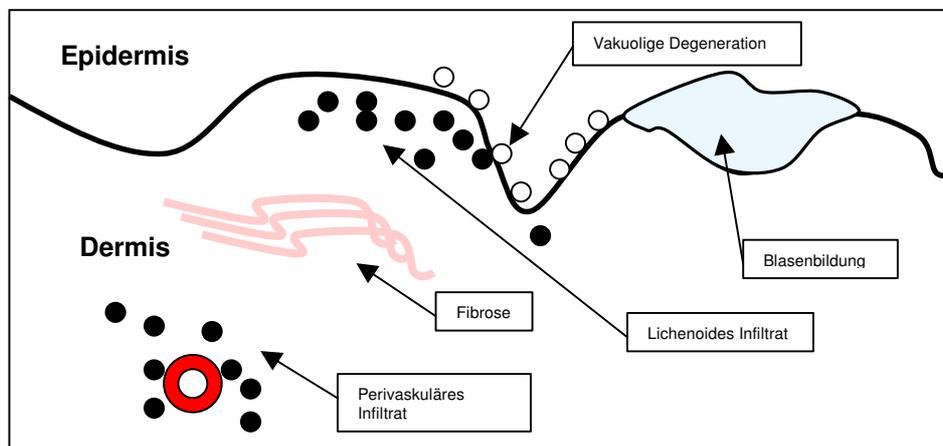


Abb. 5: Schematische Darstellung der untersuchten histologischen Parameter

Die einzelnen Präparate wurden zweifach analysiert. Die Auswertung der Parameter erfolgte, bis auf die Untersuchung der eosinophilen, neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten, die semiquantitativ ausgewertet wurden, rein qualitativ. Definiert wurde:

Symbol	Definition
+	Ein spärliches Infiltrat bis 5 Zellen pro Gesichtsfeld in der Übersicht
++	ein mildes Infiltrat mit bis von 5 bis zu 15 Zellen pro Gesichtsfeld in der Übersicht
+++	ein zahlreiches Infiltrat mit über 15 Zellen pro Gesichtsfeld in der Übersicht

Tabelle 3: Definition der semiquantitativen Infiltratauswertung (Histologie)

### 4.3 Die direkte Immunfluoreszenz (DIF)

Für die direkte Immunfluoreszenz wurden die Biopsien in gefrorenem Zustand mit Hilfe eines Kryotoms in 5 µm dünne Schnitte geschnitten, auf beschichtete Objektträger aufgebracht und mindestens 30 Minuten getrocknet. Alternativ wurde teilweise humane SS-Haut verwendet (befallene oder unbefallene Haut). Die Herstellung des SSS-Präparates wird unter Punkt 4.6 näher dargestellt.

Die anschließende Acetonfixierung schützt die Gefrierschnitte vor dem Einfluss des folgenden Färbeprozesses. Das aufgetragene Konjugat inkubiert 30 min bei Raumtemperatur. Als Konjugat dienen FITC-markierte Antikörper, die gegen verschiedene Immunglobulinklassen, Komplementkomponenten oder zellspezifische Antigene gerichtet sind. Wir benutzten Antikörper der Firma DAKO Anti-Human IgA/FITC Rabbit F(ab')<sub>2</sub> Code No. F0316; IgG/FITC Rabbit F(ab')<sub>2</sub> Code No. F0315. Nach den vorgeschriebenen Wasch- und Reinigungsvorgängen werden die Schnitte mit DAKO® Fluorescent Mounting medium containing 15mM NaN<sub>3</sub> Code: S3023 eingedeckt und bis zur

Auswertung im Dunkeln aufbewahrt, um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern.

#### **4.4 Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF)**

Für die Untersuchung der indirekten Immunfluoreszenz wird dem Patienten 10ml Blut abgenommen und die Probe bei Raumtemperatur 1 Stunde sedimentiert. Anschließend erfolgte ein 10-minütiges Zentrifugieren bei 3000U/min. Nach Abpipettieren des Serums ist das Einfrieren und Lagern bei -20° Celsius möglich. Bei der direkten Weiterverarbeitung werden zunächst Verdünnungsreihen (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640) des Patientenserums angefertigt. Als Positivkontrolle wurde ein bekanntes positives Serum auf das Substrat gegeben, für die Negativkontrolle wurde das Substrat nur mit dem Puffer behandelt. Als Substrat dienten 6-8 µm dicke Schnitte vom Affenösophagus der Firma Bios oder alternativ Humanhaut oder humane Spalthaut (nähere Erläuterung s.u.). Nach Aufpipettieren von 30 µl Patientenserum, bzw. Kontrollmedium erfolgten 3 Waschgänge mit PBS-Puffer. Anschließend wurde ein FITC-markierter goat anti human IgG-Antikörper aufpipettiert (FITC(ab)2 Fragment goat anti human IgG(Fc)Dianova 109-016-008) und 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach dem Spülvorgang erfolgte das Eindecken und die Lagerung im Kühlschrank bei 4° Celsius bis zur Auswertung. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss.

#### **4.5 Blasentypisierung mit Typ-IV-Kollagen-Antikörpern**

Für die Anfertigung von Anti-Typ IV Kollagen Präparaten wurden 4 µm dünne Paraffinschnitte auf beschichtete Objektträger Superfrost Plus der Firma Menzel gegeben, bei 60° im Brutschrank getrocknet und nach Entparaffinierung der Schnitte und Spülung mit PBS-Puffer eine halbe Stunde bei 37 ° Celsius in 0,1% Proteaselösung angedaut. Nach erneuter Spülung mit dem Puffer wurden die Schnitte 10 min. mit einem vorverdünnten Primärantikörper DAKO R N-Series Primary Mouse anti-Human Collagen IV Klon:CIV22 Code N1536 inkubiert. Nach Protokoll der Firma DAKO LSAB 2 System, Alkaline Phosphatase erfolgte im zweiten Schritt die Inkubation mit dem Brücken-Antikörper, im dritten die Präparation mit Fuchsin und dem Fuchsin-aktivierenden Agens (die Alkaline Phosphatase) und im vierten Schritt die Gegenfärbung des gefärbten Gewebes mit Hämalaun (Hersteller Mayer). Nach dem Bläuen erfolgte dann das Eindecken mit Faramount der Firma DAKO. Eine entsprechende Negativkontrolle der Firma DAKO wurde mitgeführt.

#### **4.6 Herstellung von Spalthaut (Salt-Split-Methode)**

An einem humanen Gewebestück, am besten ist humane gesunde retroaurikuläre Haut geeignet, wird durch Inkubation in einmolarer Kochsalzlösung für 2-3 Tage im Kühlschrank eine Spaltbildung in der Lamina lucida provoziert. Bei der indirekten Untersuchung auf Autoantikörperablagerungen wird dann die Bindung zirkulierender Autoantikörper im Serum der Patienten an der epidermalen, dermalen oder epidermalen und dermalen Seite des Spaltes nachgewiesen. Im direkten Test wird ein paraläsional entnommenes Biopsat in einmolarer Kochsalzlösung inkubiert und die Lokalisation der in vivo gebundenen Autoantikörper wiederum als epidermales, dermales oder gemischtes Muster bestimmt (59).

Bevorzugt wird die Untersuchung an lichtgeschützter retroaurikulärer Haut durchgeführt, da lichtexponierte Haut nicht selten in der oberen Dermis unspezifische Immunglobulinablagerungen aufweist (59).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Demografische Daten

Eine tabellarische Gesamtübersicht der wichtigsten demografischen und klinischen Daten bzw. Merkmale zeigt Tabelle 4. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Ergebnisse im Einzelnen eingegangen werden.

Nr.	Alter	Geschlecht	Latenz	Enoral	Okulär	Genital	Kutan	Nasal
1	50	M	48	+	-	-	-	-
2	63	W	84	+	+	+	-	+
3	63	M	72	+	-	-	-	-
4	55	W	7	+	-	+	-	-
5	66	W	12	+	-	-	-	-
6	58	W	120	+	+	+	-	-
7	73	W	11	+	+	-	-	-
8	68	M	2	+	+	-	-	-
9	39	W	60	-	+	-	-	-
10	74	M	6	-	-	-	+	-
11	72	W	24	+	+	-	-	-
12	87	M	2	+	-	-	-	-
13	61	W	7	+	-	-	+	-
14	54	M	2	+	+	-	+	-
15	64	M	72	+	+	+	-	-
16	62	W	6	+	-	-	+	-
17	87	W	55	+	+	-	-	-
18	77	W	6	-	+	-	-	-
19	69	W	36	-	+	-	-	-
20	46	M	24	-	+	-	-	-
21	64	W	37	+	+	-	-	-
22	82	M	15	-	+	-	-	-
23	50	W	12	+	-	-	-	-
24	77	W	1	+	-	-	-	-
25	61	M	48	-	-	-	+	-

Tabelle 4: Demografische und klinische Daten und Merkmale der Patientenpopulation (Alter = Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Latenz = Zeitraum von ersten Symptomen bis zur Diagnosestellung in Monaten)

### 5.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Das mittlere Alter aller Patienten zum Diagnosezeitpunkt befindet sich bei  $65,9 \pm 12,1$  Jahre. Bei einer geschlechtsspezifischen Unterteilung ergibt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des mittleren Erkrankungsalters. Die Geschlechtsverteilung zeigte eine Verteilung von 1,5:1 Frauen zu Männern.

	n	Mittleres Diagnosealter
Frauen	15	$64,5 \pm 11,2$ Jahre
Männer	10	$65,4 \pm 14,0$ Jahre
Gesamt	25	$64,9 \pm 12,1$ Jahre

Tabelle 5: Altersverteilung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

### 5.1.2 Diagnosestellung/Latenzzeit

Die Latenzzeit vom Zeitpunkt des Auftretens der ersten Symptome bis zur Diagnostikstellung ist einer relativ großen Schwankungsbreite unterworfen. Die mittlere Latenz beträgt bei allen Patienten  $31 \pm 31$  Monate mit einem Minimalwert von 1 Monat bis zu maximal 120 Monaten.

Diese relativ große Streuung mag zum einen an den anfänglich zunächst unspezifischen oder diskreten Erstsymptomen, als auch an der späten bioptischen Sicherung der Diagnose liegen.

## 5.2 Klinische Ergebnisse

### 5.2.1 Betroffene Schleimhautregionen/Organe

92% aller Patienten (23/25) wiesen zum Zeitpunkt der Diagnostikstellung klinische Symptome im Bereich der Schleimhäute auf. Eine klinische Mitbeteiligung des

kutanen Integumentes fand sich bei 20% (5/25). Das Muster der Schleimhautbeteiligung gibt Abb. 6 und Tabelle 6 wieder.

Das häufigst betroffene Schleimhautkompartiment stellt die Mundschleimhaut dar. Kaum weniger häufig ist die Konjunktiva der Patienten betroffen. Eine Beteiligung der genitalen oder nasalen Schleimhäute ist dagegen deutlich seltener.

Region	Häufigkeit
Enoral	17/25 (68%)
Okulär	15/25 (60%)
Genital	4/25 (16%)
Kutan	5/25 (20%)
Nasal	1/25 (4%)

Tabelle 6: Verteilung des Schleimhautbefalles zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

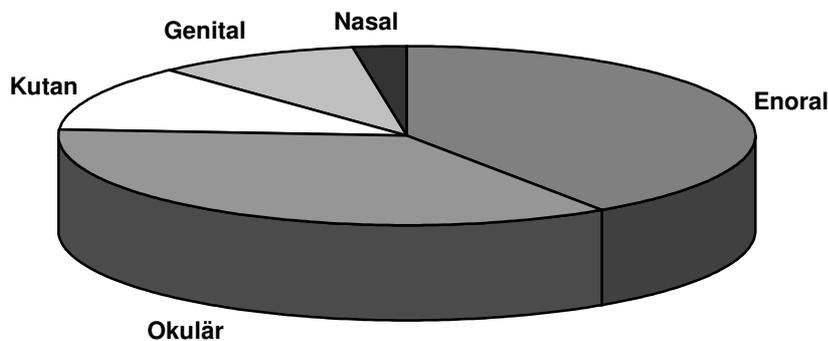


Abb. 6: Verteilung des Schleimhautbefalles zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Eine rein monosymptomatische Beteiligung nur *eines* Schleimhautorgans oder der Haut findet sich in 52% (13/25) der Fälle. Hierbei sind die reine Beteiligung

der Konjunktiva 24% (6/25), bzw. der Mundschleimhaut 24% (6/25) dominierend.

Die Einbeziehung mehrerer verschiedener Schleimhautregionen bzw. der Haut in den Krankheitsprozeß und deren Häufigkeit veranschaulicht Abbildung 7.

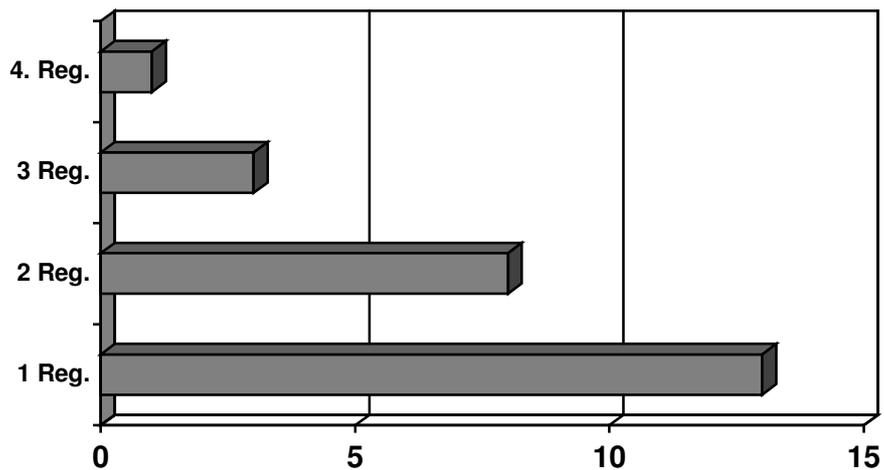


Abb. 7: Häufigkeit der Anzahl der betroffenen Schleimhaut-/Hautregionen (okulär, enoral, nasal, genital und/oder kutan; 1-4 betroffene Regionen): Die wenigsten Patienten hatten mehr als 1-2 Schleimhautregionen involviert.

Es zeigt sich, dass die gleichzeitige klinische Manifestation mehrerer Schleimhautregionen seltener ist. Der überwiegende Anteil der Patienten zeigt klinisch nur den Befall einer oder zweier Lokalisationen.

## 5.2.2 Klinische Manifestationen (Bildteil)

### 5.2.2.1 okulärer Befall



Abb. 8: VP der KSH: unilaterale Konjunktivitis, Tauber Stadium 1



Abb. 9: VP der KSH: unilaterale, akut entzündliche Konjunktivitis, Tauber Stadium 1



Abb. 10: VP der KSH: Beginnende Symblepharonbildung, konjunktivale Vaskularisation, Fornixverkürzung, Tauber Stadium 3

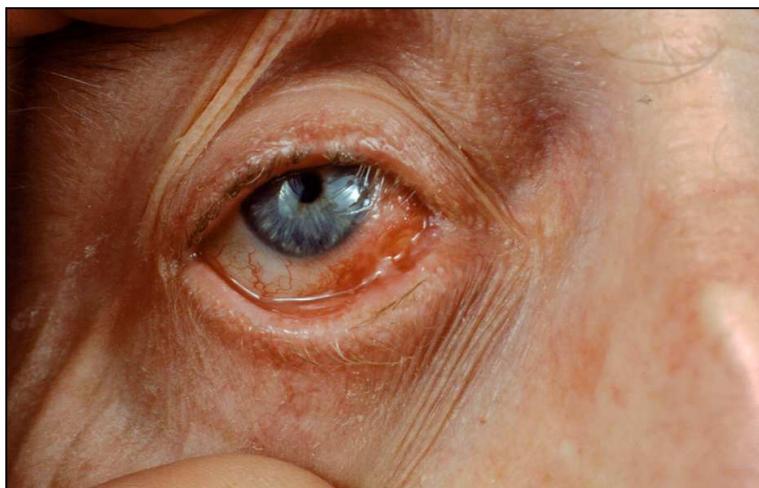


Abb. 11: VP der KSH: Beginnende Symblepharonbildung, deutliche konjunktivale Vaskularisation, Fornixverkürzung, Tauber Stadium 3



Abb. 12: VP der KSH: Symblepharonbildung, konjunktivale Vaskularisation, Fornixverkürzung, Deutliche Keratinisierung der Hornhautoberfläche, Tauber Stadium 4



Abb. 13: VP der KSH: Symblepharonbildung, Fornixverkürzung, deutliche Keratinisierung der Hornhautoberfläche, Ankyloblepharon, Tauber Stadium 4 (Endstadium)

### 5.2.2.2 enoraler Befall



Abb. 14: VP der MSH: Desquamative marginale Gingivitis



Abb. 15: VP der MSH: Blasenbildung und Ulcerationen des harten und weichen Gaumens.



Abb. 16: VP der MSH: Desquamative Gingivitis, Erosionen und beginnende Fibrose



Abb. 17: VP der MSH: Buccale Fibrose, Narbenbildung



Abb. 18: VP der MSH: Buccale Erosion nach Blasenbildung und retikuläre, streifige Fibrose im Randbereich



Abb. 19: VP der MSH: Lichenoide Variante

### 5.2.2.3 genitaler Befall



Abb. 20: VP der GSH: Akut entzündliche Erosionen und randständige Fibrose der Genitalschleimhaut



Abb. 21: VP der GSH: Lichen mucosus artiges Bild mit einzelnen randständigen Erosionen.

#### 5.2.2.4 kutaner Befall



Abb. 22: VP der Haut: Blasen, krustig belegte Erosionen, Narbenbildung im Bereich der Stirn



Abb. 23: VP der Haut: frische Blasen und Erosionen im Bereich mit hoher mechanischer Beanspruchung

### 5.2.3 Klinischer Verlauf

Unter 5.2.3.2 geben wir der Vollständigkeit halber die aktuellen Therapien der Patienten zum Zeitpunkt der Datenerfassung und deren Ansprechen auf diese Therapie an.

### 5.2.4 Therapie

Nr.	Alter	Llatenz	aktuelle Therapie	Ansprechen	Sonstiges
1	50	48	TAClo; GKSlo	↔	-
2	63	84	GKSsy; MMF	↑	
3	63	72	GKSlo	↔	Beschwerdefrei
4	55	7	MMF; GKSsy	↑	Beschwerdefrei
5	66	12	GKSlo; TAClo	↓	
6	58	120	MMF; GKSsy	↑	
7	73	11	CYP	↔	
8	68	2	MMF; GKSsy	↔	
9	39	60	MMF; GKSsy	↑	
10	74	6	GKSlo	↑	
11	72	24	MMF	↑	
12	87	2	GKSlo	↑	
13	61	7	MMF; GKSsy	↑	
14	54	2	GKSsy	↓	CLL unter Chemotherapie
15	64	72	TAClo; GKSlo	↑	
16	62	6	GKSsy	↑	
17	87	55	MMF; GKSsy	↑	
18	77	6	-	↑	Hypernephrom, nach OP Verbesserung SHP
19	69	36	MMF; GKSsy	?	Keine WV
20	46	24	CYP; GKSsy	↔	
21	64	37	GKSsy; MMF	↓	
22	82	15	GKSlo, TAClo	↔	
23	50	12	GKSsy	↑	Abgeheilt
24	77	1	GKSlo	↑	
25	61	48	GKSlo	↑	

Tabelle 7: Aktuelle Therapien und klinisches Ansprechen (Abk: GKSsy = Steroide systemisch, GKSlo = Steroide lokal, MMF = Mykophenolatmofetil, CYP = Cyclophosphamid-Stoßtherapie, TAClo = Tacrolimus lokal; ↔ = Befund stabil, ↑ = Befund verbessert, ↓ = Befund verschlechtert)

### 5.3 Histologische Ergebnisse

Eine tabellarische Übersicht der zentralen histologischen Parameter der verschiedenen Schnitte findet sich in der Tabelle 8.

Zur genauen Beschreibung der Methoden, Materialien und Geräte, die für die histologischen Präparate verwendet und zur Auswertung herangezogen wurden, verweisen wir auf Kapitel 4.

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenooides Infiltrat	Fibrose
1	MSH	-	-	+	+++	+	-	-	+
2	MSH	-	+	-	+	+	+	+	(+)
2	KSH	+	+	+	-	+	++	-	+
2	GSH	+		-	+	+	+	+	+
3	MSH	+	(+)	+	+	+	+	?	+
4	MSH	(+)	+	+	-	+	-	+	-
4	GSH	+	+	-	-	+	-	+	-
5	MSH	-	+	+	-	+	-	+	+
6	MSH	+	+	+	+	+	+	+	-
6	GSH	+	+	+	++	+	-	+	+
7	n.d.								
8	MSH	Epithel nicht. vorhanden		+	+++	-	++	-	-
9	KSH	+	-	-	-	+++	+	-	-
10	H	+	-	++	+	+	-	-	+
11	MSH	+	-	+	-	+	-	-	+
12	MSH	+	+	+	+	-	++	+	+
13	MSH	+	-	+	+	+	+	-	+
13	H	+	+	+	-	++	-	+	+
14	MSH	-	+	-	+	-	-	+	-
14	KSH	-	+	-	-	-	-	-	+
15	MSH	+	-	+	+	+	-	-	+
16	MSH	+	-	+	-	+	-	-	+
17	n.d.								
18	KSH	+	-	-	+	+	-	-	++
19	KSH	-	+	-	+	+	+	-	++
20	KSH	-	+	-	+	+	+	-	++
21	n.d.								
22	KSH	-	+	-	-	+	-	-	-
23	MSH	+	-	++	-	+	-	-	+
24	MSH	+	+	++	-	+	+	+	+
25	H	+	-	-	++	+	-	-	-

Tabelle 8: Übersicht der histologischen Merkmale der Biopsate (MSH: Mundschleimhaut, KSH: Konjunktivalschleimhaut, GSH: Genitalschleimhaut, H: Haut)

Es wurden 28 Präparate von 22 Patienten untersucht. Insgesamt wurden 15 Biopsate der Mundschleimhaut, 7 der Konjunktivalschleimhaut, 3 der Genitalschleimhaut und 3 kutane Biopsien entnommen. Im Folgenden werden die histologischen Befunde entsprechend ihrer Entnahmestelle getrennt dargestellt.

### 5.3.1 Histologie der Mundschleimhaut (MSH)

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
1	MSH	-	-	+	+++	+	-	-	(+)
2	MSH	-	+	-	+	+	+	+	(+)
3	MSH	+	(+)	+	+	+	+	?	+
4	MSH	(+)	+	+	-	+	-	+	-
5	MSH	-	+	+	-	+	-	+	+
6	MSH	+	+	+	+	+	+	+	-
8	MSH	Epithel nicht. Vorhanden		+	+++	-	++	+	-
11	MSH	+	-	+	-	+	-	-	+
12	MSH	+	+	+	+	-	++	+	+
13	MSH	+	-	+	+	+	+	-	+
14	MSH	-	+	-	+	-	-	+	-
15	MSH	+	-	+	+	+	-	-	+
16	MSH	+	-	+	-	+	-	-	+
23	MSH	+	-	++	-	+	-	-	(+)
24	MSH	+	+	++	-	+	+	+	(+)

Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
71,4%	57,1%	86,7%	60%	80%	46,7%	53,3%	73,3%

Tabelle 9: Histologische Merkmale des VP der MSH

Die Biopsien, entnommen aus der MSH, zeigen überwiegend ein relativ monomorphes Bild mit Zeichen einer subepidermalen Spaltbildung, Eosinophilie, einer milden Fibrose und einem häufig zu findendem lichenoiden Infiltratmuster. Wie zu erwarten, besteht das Infiltrat auch lokalisationsbedingt aus Plasmazellen und zahlreichen Eosinophilen. Bei keinem der Präparate findet sich eine neutrophile oder eosinophile Spongiose, wie sie für das bullöse Pemphigoid charakteristisch ist.

Zusätzlich zeigten alle Präparate mit lichenoidem Infiltrat eine bandartige Anordnung des Infiltrates sowie ein Akanthotisch verbreitertes Epithel mit

Hypergranulose. Klinisch wies keiner der Patienten an anderen Stellen einen Lichen ruber auf.

### 5.3.2 Histologie der Konjunktivalschleimhaut (KSH)

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
2	KSH	+	+	+	-	+	++	-	(+)
9	KSH	+	-	-	-	+++	+	-	-
14	KSH	-	+	-	-	-	-	-	+
18	KSH	+	-	-	+	+	-	-	++
19	KSH	-	+	-	+	+	+	-	++
20	KSH	-	+	-	+	+	+	-	++
22	KSH	-	+	-	-	+	-	-	-

Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
42,9%	71,4%	14,3%	42,9%	85,7%	57,1%	0%	71,4%

Tabelle 10: Histologische Merkmale des VP der KSH.

Auffällig an den Histologien der Konjunktivalschleimhaut ist das fast komplette Fehlen der Eosinophilen im entzündlichen Infiltrat. Es überwiegt ein lymphozytäres Muster. Die Fibrose ist in den meisten Fällen relativ stark ausgeprägt. Eine subepidermale Spaltbildung findet sich in weniger als der Hälfte der Fälle und bei Patient 2 und 22 zeigte sich ein tiefes, diffuses Infiltrat, allerdings wies kein Präparat ein lichenoides Muster auf. Auch hier vermisst man Zeichen einer Spongiose.

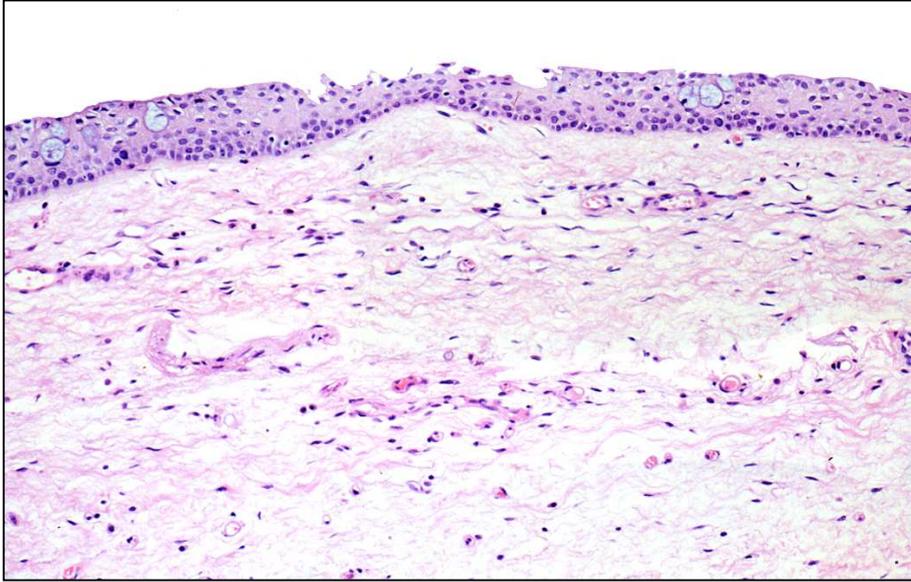


Abb. 24: Histologie der KSH: Frühstadium: Fehlender Nachweis von Eosinophilen, diskrete Fibrose subepidermal, keine Spaltbildung

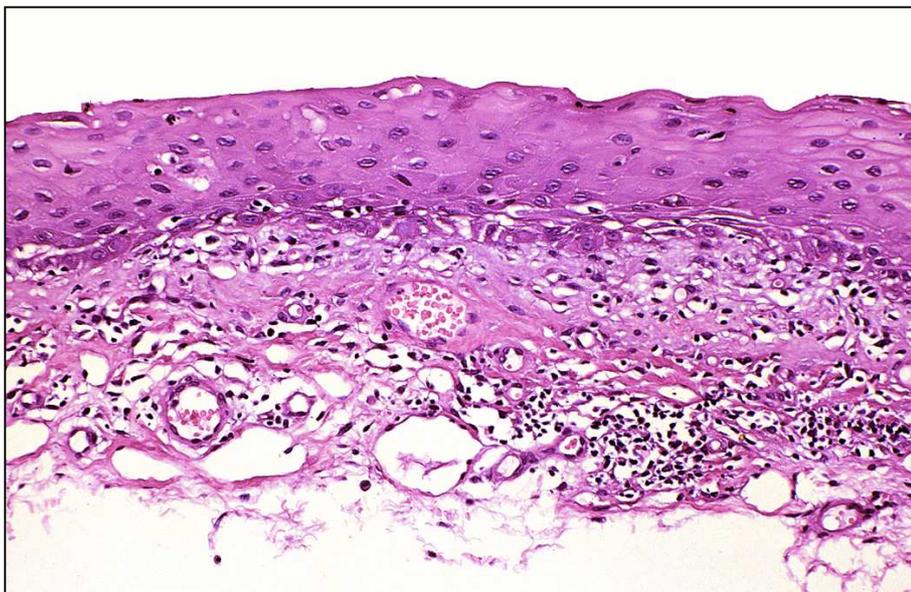


Abb. 25: Histologie der KSH: Fehlender Nachweis von Eosinophilen, subepidermale Fibrose, Gefäßproliferation, keine Spaltbildung

Die Histologien der Patienten mit reinem okulären Befall (POCP) unterscheiden sich diskret von denen mit multilokulären Befall mit okulären Befall (OCP). Deutliche Unterschiede wie sie in der Immunfluoreszenzdiagnostik nachweisbar sind, lassen sich in der Histologie nicht nachweisen. Bermerkenswert ist allerdings, dass der einzige Patient mit Nachweis von Eosinophilen ein Fall von OCP war. Auch findet sich eine vakuolige Degeneration und die Fibrose in allen Histologien von OCP-Patienten, aber nur in der Hälfte der POCP Patienten (Tabelle 11). Es sei hierbei allerdings nochmals auf die relativ kleine Anzahl der zur Verfügung stehenden Biopsien aus KSH hingewiesen.

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
9	KSH	+	-	-	-	+++	+	-	-
18	KSH	+	-	-	+	+	-	-	++
19	KSH	-	+	-	+	+	+	-	++
22	KSH	-	+	-	-	+	-	-	-

	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
POCP	50%	50%	0%	50%	100%	50%	0%	50%
OCP	33%	100%	33%	33%	66%	66%	0%	100%

Tabelle 11: Histologische Merkmale der Biopsien von Patienten mit POCP (rein okuläres VP)

### 5.3.3 Histologie der Genitalschleimhaut (GSH)

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
2	GSH	+		-	+	+	+	+	+
4	GSH	+	+	-	-	+	-	+	-
6	GSH	+	+	+	++	+	-	+	+

Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
100%	66,7%	33,3%	66,7%	100%	33,3%	100%	66,7%

Tabelle 12: Histologische Merkmale des VP der GSH

Alle Proben der GSH zeigen Zeichen einer Spaltbildung. Das Infiltrat ist auffälligerweise durchweg in lichenoider Anordnung zu finden und weist fast ein reines lymphozytäres Muster auf. Zeichen der Spongiose fehlen auch hier. Es findet sich zu 100% eine subepidermale Spaltbildung.

### 5.3.4 Histologie der Haut

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
10	H	+	-	++	+	+	-	-	+
13	H	+	+	+	-	++	-	+	+
25	H	+	-	-	++	+	-	-	-

Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
100%	33,3%	66,6%	66,6%	100%	0%	33,3%	66,6%

Tabelle 13: Histologische Merkmale des VP der Haut

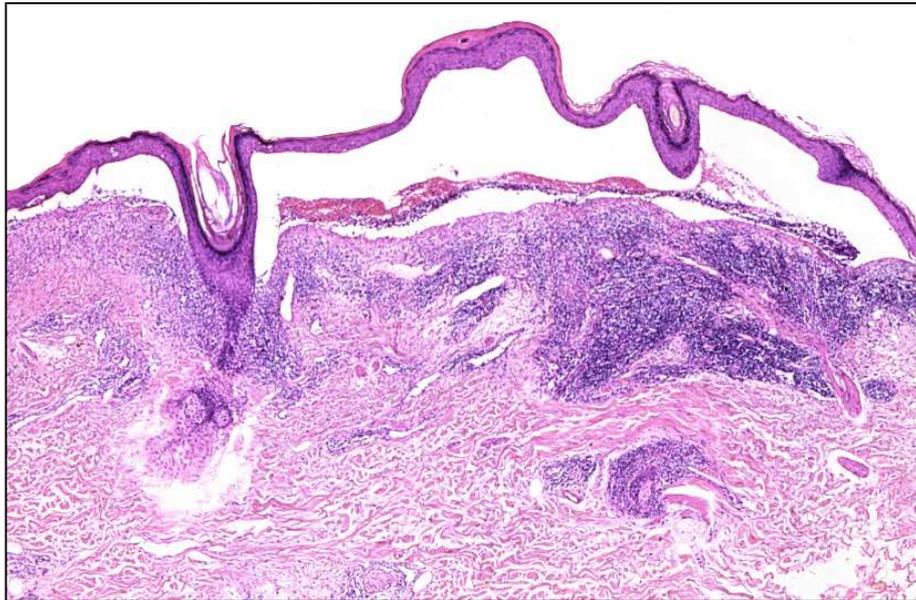


Abb. 26: VP der Haut: Deutliche subepidermale Blasenbildung, kräftiges Infiltrat.

### 5.3.5 Lokalisationsabhängige histologische Besonderheiten des VP

Wie schon oben angedeutet finden sich einzelne, aber charakteristische Unterschiede in der Histologie des VP im Vergleich der Entnahmestellen (Abb. 27 und Tab.14).

	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
MSH	71,4%	57,1%	86,7%	60%	80%	46,7%	53,3%	73,3%
KSH	42,9%	71,4%	14,3%	42,9%	85,7%	57,1%	0%	71,4%
GSH	100%	66,7%	33,3%	66,7%	100%	33,3%	100%	66,7%

Tabelle 14: Vergleich der histologische Merkmale des VP verschiedener SH-Regionen

	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
POCP	50%	50%	0%	50%	100%	50%	0%	50%
OCP	33%	100%	33%	33%	66%	66%	0%	100%

Tabelle 15: Vergleich der histologische Merkmale des VP vom Typ des OCP und POCP.

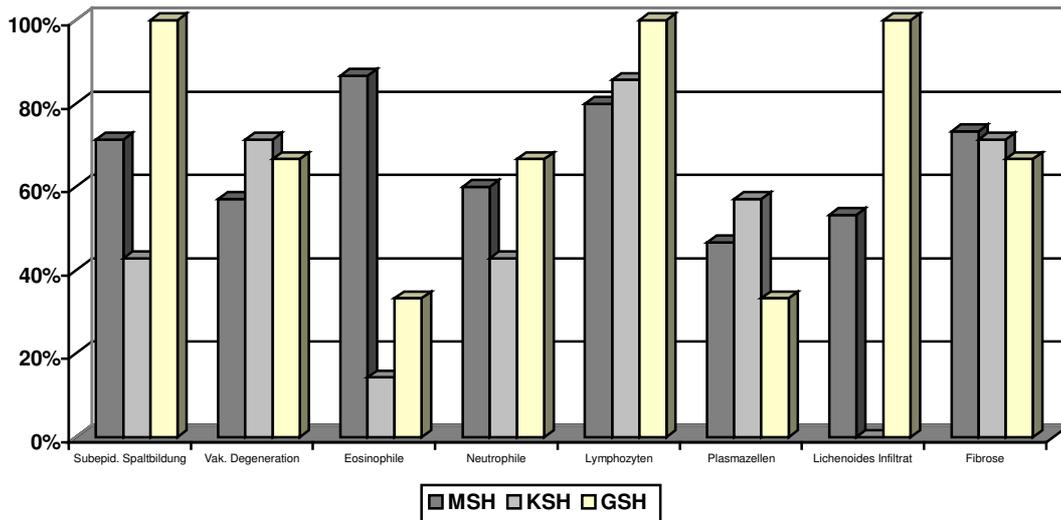


Abb. 27: Vergleich der histologischen Merkmale des VP verschiedener SH-Regionen

Nahezu identische Verteilungsmuster unabhängig von der Schleimhautlokalisation fanden sich bei den Merkmalen Fibrose, vakuolige Degeneration und der Verteilung von Lymphozyten und Plasmazellen. Deutliche Unterschiede zeigten sich hinsichtlich der Parameter subepidermale Spaltbildung, lichenoides Infiltrat sowie der Verteilung der Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten.

Auch wenn sich hinsichtlich der prozentualen Nachweisbarkeit der Fibrose an den unterschiedlichen Lokalisationen kein Unterschied zeigt, ist die Ausprägung der Fibrose an der KSH wesentlich deutlicher und stärker ausgeprägt als bei der MSH und der GSH.

Auffällig ist der deutliche Unterschied im Nachweis von Eosinophilen im Infiltrat. Diese fehlen fast komplett in den Biopsien aus der KSH und sind dagegen fast

pathognomonisch für die Proben aus der MSH. Deutlich ist die Kombination von kompletten Fehlen der Eosinophilie in Verbindung mit ausgeprägter Fibrose in der KSH. In der MSH ist die Fibrose kombiniert mit deutlicher Eosinophilie, wobei die Fibrose aber schwächer ausgeprägt erscheint.

Das häufigere Vorkommen von neutrophilen Granulozyten in Biopsaten aus der MSH im Gegensatz zu Biopsaten aus der KSH ist möglicherweise auf unterschiedliche entzündliche Einflüsse auf das jeweilige Oberflächengrenzorgan zurückzuführen. Diese Befunde sind hinsichtlich der Entzündungspathogenese des VP eher von untergeordneter Relevanz.

Das Auftreten einer sichtbaren subepidermalen Spaltbildung findet sich häufiger in Proben der MSH und GSH und ist in der KSH bei nicht einmal der Hälfte der Proben zu finden. Bei der Entstehung der sichtbaren Spaltbildung könnte die erhöhte mechanische Beanspruchung der Schleimhäute durchaus eine Rolle spielen.

Das Vorkommen des bandförmigen, lichenoiden Infiltrates findet sich häufiger in den Schleimhautregionen, die auch gleichzeitig eine Spaltbildung aufzeigten. Am häufigsten fand sich dieses Phänomen in der MSH und GSH, dagegen nie in der KSH. In den drei Proben der GSH korreliert dieser Parameter zu 100%. Das Auftreten einer Spaltbildung setzt allerdings ein lichenoides Infiltrat nicht zwingend voraus.

Das Maß der Fibrose ist eindeutig in den Proben aus der KSH am stärksten ausgeprägt. Dies mag zum einen an lokalisationsbedingten Faktoren der erhöhten Empfindlichkeit der Schleimhäute liegen, kann aber auch über den späteren Zeitpunkt der Probenentnahme erklärlich sein. Die Probepbiopsien an der KSH werden aus verständlichen Gründen meist erst in fortgeschrittenen Stadien entnommen. Hierbei ist die Vernarbung schon klinisch deutlicher ausgeprägt.

### 5.3.6 Histologische Varianten

Bei der Durchsicht der Gesamtheit der Präparate unabhängig vom Entnahmeort fallen Merkmale auf, die eine Einteilung in drei verschiedene histologische Varianten des VP rechtfertigen. Es erscheint wenig sinnvoll, eine Einteilung anhand der Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates vorzunehmen, da hier nur marginale Unterschiede festzustellen sind. Weitaus auffälliger ist die Anwesenheit bzw. Abwesenheit der Fibrose. Da die Fibrose zum einen eine nicht zu unterschätzende klinische Relevanz, insbesondere bei dem okulären VP zukommt, zum anderen auf eine abgelaufene stärkere entzündliche Aktivität hinweist, ist diesem Merkmal eine große Bedeutung zuzusprechen. Dies ist von einem therapeutischen und prognostischem Wert.

Neben dem Merkmal der Fibrosierung fallen bei einer Reihe von Präparaten Entzündungsmuster auf, die in ihrer Lokalisation und Verteilung dem einer lichenoiden Reaktion sehr stark gleichen. Ähnlich dem Lichen ruber mucosus zeigt sich eine bandförmige subepidermale Anordnung des Infiltrates. Korrespondierend findet sich eine vakuolige Degeneration der basalen Keratinozyten. Dieses Phänomen der lichenoiden Variante findet sich nur bei einem Teil der Biopsien und nur an der Mund – und Genitalschleimhaut. Eine genauere Darstellung erfolgt im weiteren Text.

Das VP zeigt an der MSH und GSH in einigen Fällen klinisch erstaunliche Ähnlichkeiten mit einem Lichen ruber mucosus (Siehe Kap. 5.2). Teilweise wurde lange vor Diagnose des VP bei einigen Patienten ein Lichen ruber mucosus diagnostiziert und erst Jahre später bei Auftreten eindeutiger Blasen oder Befall anderer Schleimhäute durch die subepidermale Spaltbildung in der Histologie und die positive Immunfluoreszenz die richtige Diagnose eines VP gestellt.

Diese histologische Variante äußerte sich als subepidermale Spaltbildung oder Blase mit dichtem bandartigem Infiltrat aus Lymphozyten, Plasmazellen und

vereinzelt eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Das Epithel ist akanthotisch verbreitert und weist Hypergranulose und vakuolige Degeneration der BMZ auf.

Erstaunlicherweise sahen wir histologisch recht häufig ein lichenoides Infiltrat in der MSH (8/15) und in allen Fällen von GSH-Befall (3/3). An der KSH konnten ein lichenoides Infiltrat nie beobachtet werden.

#### **5.3.6.1 Vernarbendes Schleimhautpemphigoid mit Fibrose**

Diese histologische Variante des VP findet sich in der überwiegenden Anzahl der Proben (20/27). Sie konnte an Biopsaten aus allen Lokalisationen nachgewiesen werden. Abbildungen 28 und 29 zeigen exemplarisch die entsprechende Histologie aus der MSH.

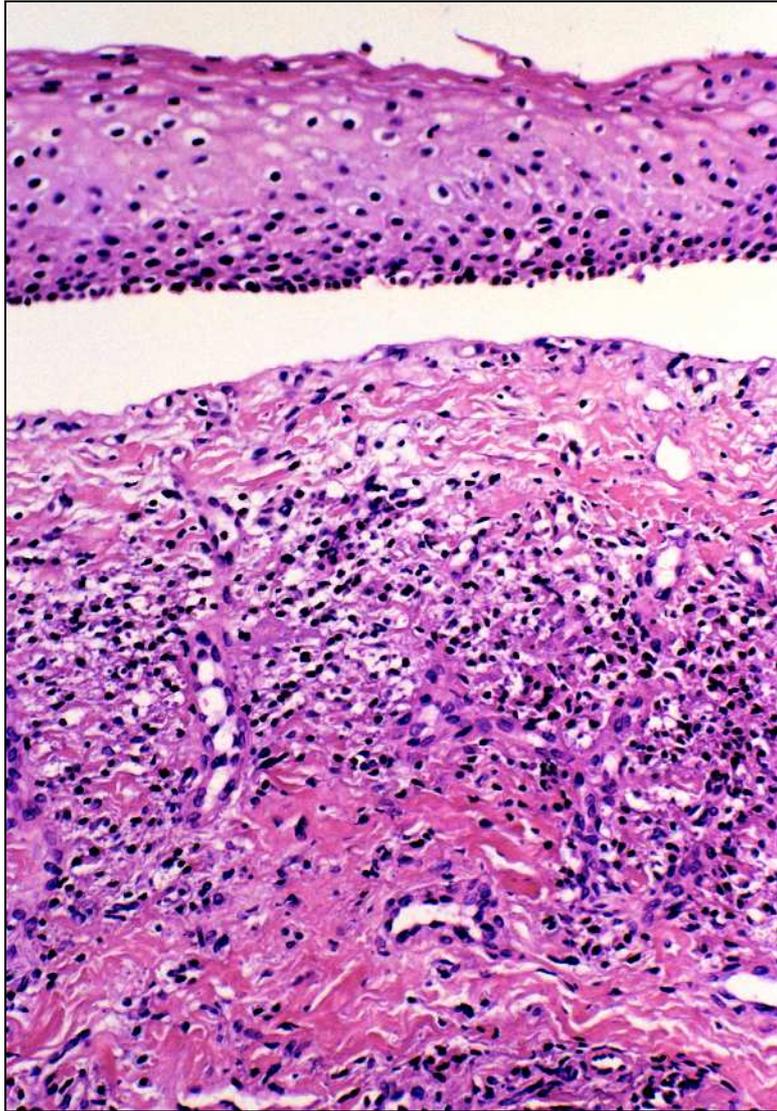


Abb. 28: VP mit deutlicher Fibrose und Spaltbildung aus der MSH

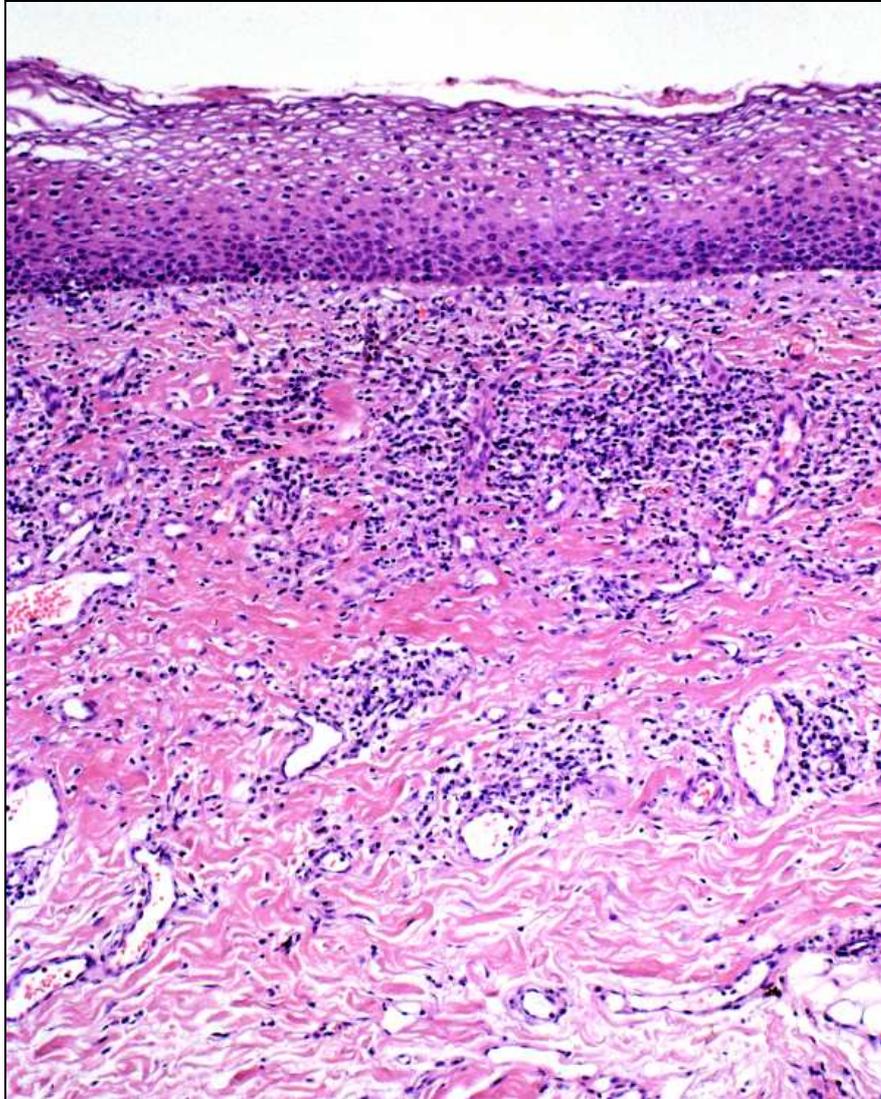


Abb. 29: VP mit deutlicher Fibrose ohne Spaltbildung aus der MSH

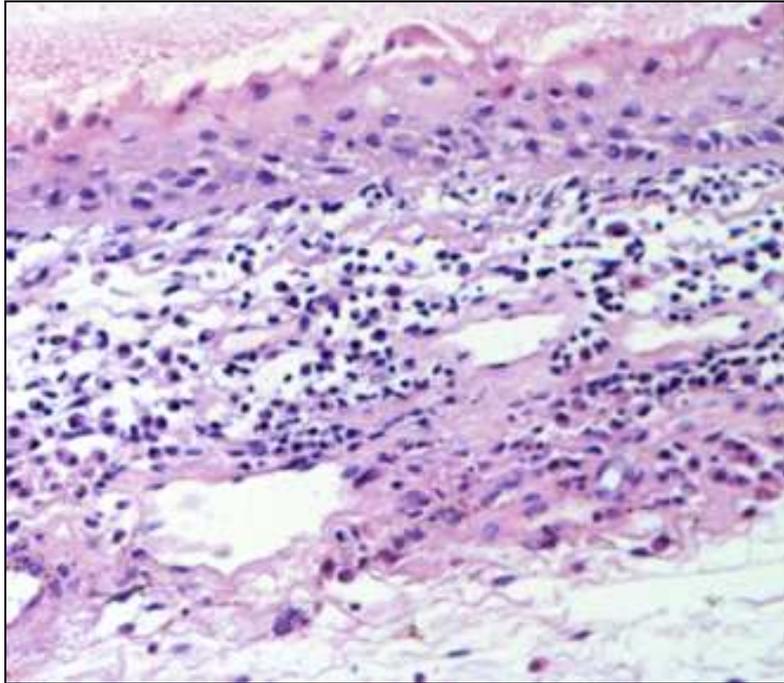


Abb. 30: VP mit Fibrose ohne Spaltbildung aus der KSH

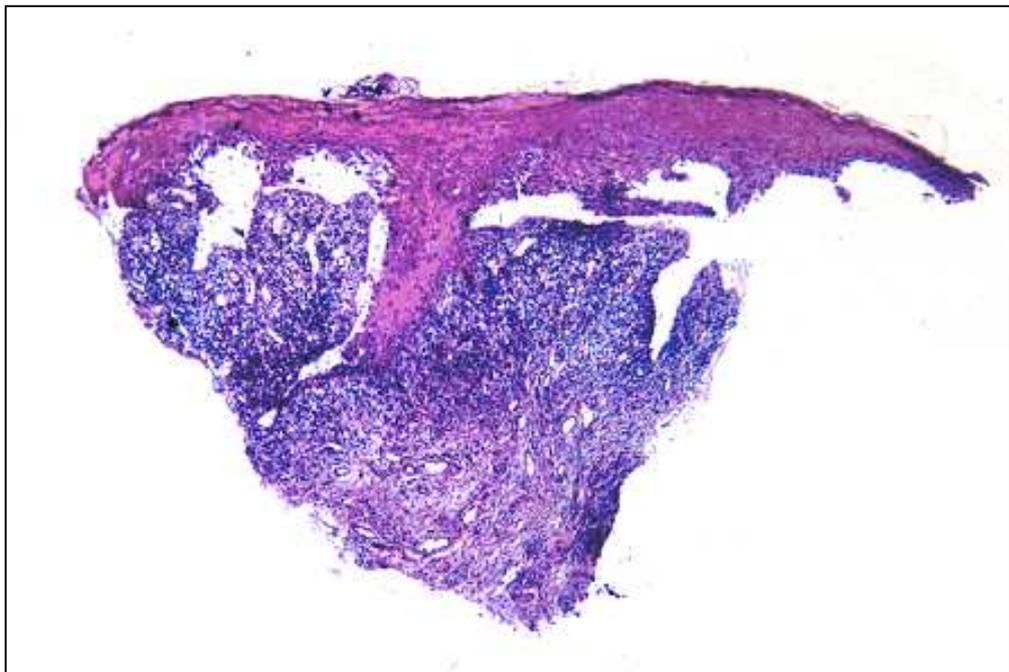


Abb. 31: VP mit deutlicher Fibrose und Spaltbildung aus der GSH

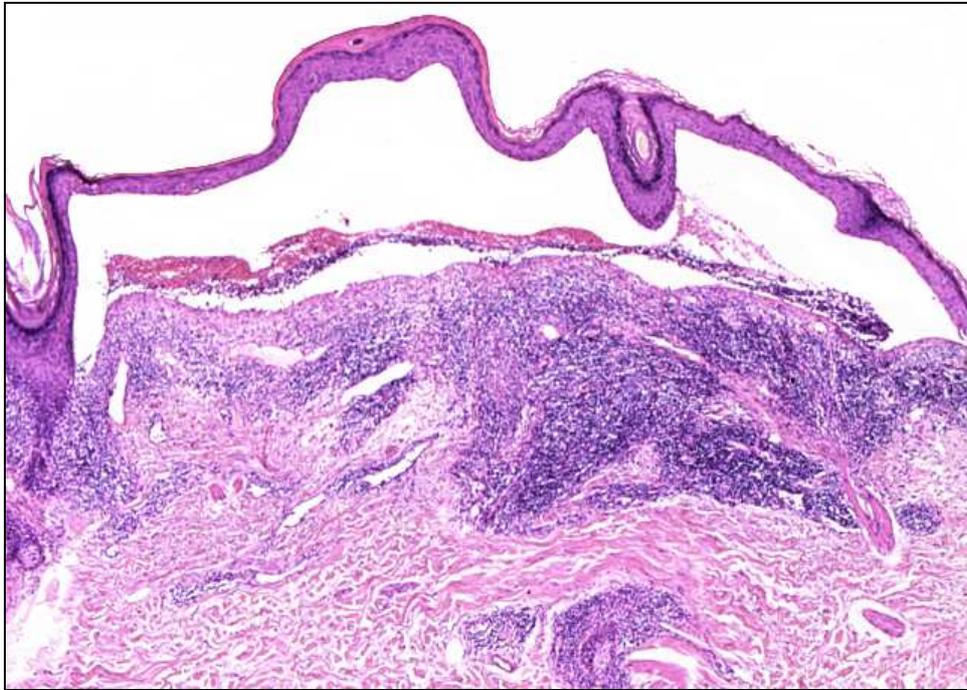


Abb. 32: VP mit deutlicher Fibrose und Spaltbildung aus der Haut

In der folgenden Tabelle 16 sind die Befunde aller Histologien mit Zeichen der Fibrose dargestellt:

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
1	MSH	-	-	+	+++	+	-	-	(+)
2	MSH	-	+	-	+	+	+	+	(+)
2	KSH	+	+	+	-	+	++	-	(+)
2	GSH	+		-	+	+	+	+	+
3	MSH	+	(+)	+	+	+	+	?	+
5	MSH	-	+	+	-	+	-	+	+
6	GSH	+	+	+	++	+	-	+	+
10	H	+	-	++	+	+	-	-	+
11	MSH	+	-	+	-	+	-	-	+
12	MSH	+	+	+	+	-	++	+	+
13	MSH	+	-	+	+	+	+	-	+
13	H	+	+	+	-	++	-	+	+
14	KSH	-	+	-	-	-	-	-	+
15	MSH	+	-	+	+	+	-	-	+
16	MSH	+	-	+	-	+	-	-	+
18	KSH	+	-	-	+	+	-	-	++
19	KSH	-	+	-	+	+	+	-	++
20	KSH	-	+	-	+	+	+	-	++
23	MSH	+	-	++	-	+	-	-	(+)
24	MSH	+	+	++	-	+	+	+	(+)

Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
70,0%	55%	70%	60%	90%	45%	35%	100%

Tabelle 16: Histologische Merkmale des VP mit Nachweis einer Fibrose

Auffällig ist, dass in der Gesamtheit der Präparate mit Nachweis von Fibrose zumeist auch eine Eosinophilie nachweisbar ist (14/20). Innerhalb der verschiedenen Lokalisationen ergeben sich allerdings deutlich Unterschiede hinsichtlich dieses gemeinsamen Vorkommens (Abbildung 33).

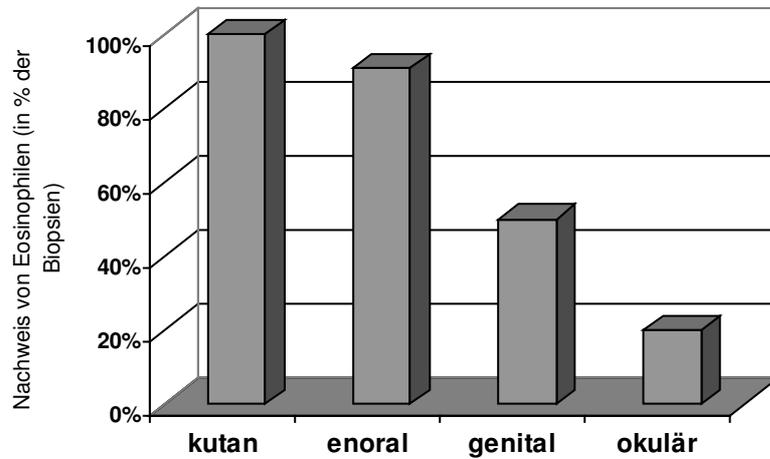


Abb. 33: Nachweis von Eosinophilie (in %) im Infiltrat von Fibrose + Biopsaten von VP in Abhängigkeit von der Lokalisation.

So weisen 91% (10/11) der MSH-Biopsien mit Fibrose eine z.T. ausgeprägte Eosinophilie, allerdings nur 20% (1/5) der KSH-Biopsien diese auf. (Tabelle 17).

Lokalisation	VP +Fibrose	VP -Fibrose
MSH	73,3%	26,7%
KSH	71,4%	28,6%
GSH	66,7%	33,3%
H	66,6%	33,3%

Tabelle 17: Häufigkeit des Merkmales Fibrose bei VP verschiedener SH-Regionen

### 5.3.6.2 Vernarbendes Schleimhautpemphigoid ohne Fibrose

Die Biopsien, die keine manifeste Fibrose aufweisen, sind naturgemäß weniger häufig zu erwarten. In unserem Untersuchungsgut konnten wir 8 Biopsien (29%) ohne Nachweis einer Fibrose finden. In der Gesamtheit der Befunde zeigt sich ein deutlich erniedrigter Anteil von Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten gegenüber den Biopsaten ohne Fibrose. Dagegen findet sich häufiger das Merkmal der vakuoligen Degeneration und des lichenoid angeordneten Infiltrates.

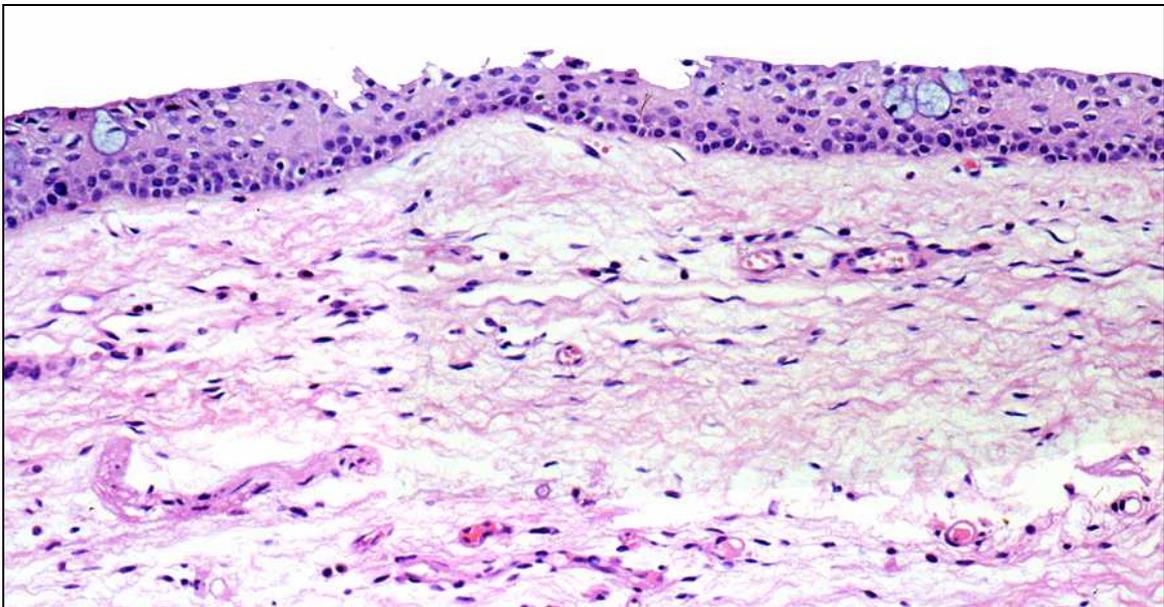


Abb. 34: VP der KSH im frühen Stadium ohne Nachweis einer übermäßigen Fibrose

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
4	MSH	(+)	+	+	-	+	-	+	-
4	GSH	+	+	-	-	+	-	+	-
6	MSH	+	+	+	+	+	+	+	-
8	MSH	Epithel nicht. vorhanden		+	+++	-	++	-	-
9	KSH	+	-	-	-	+++	+	-	-
14	MSH	-	+	-	+	-	-	+	-
22	KSH	-	+	-	-	+	-	-	-
25	H	+	-	-	++	+	-	-	-

Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
71,4%	71,4%	37,5%	50%	75%	37,5%	50%	0%

Tabelle 18: Histologische Merkmale des VP ohne Nachweis einer Fibrose

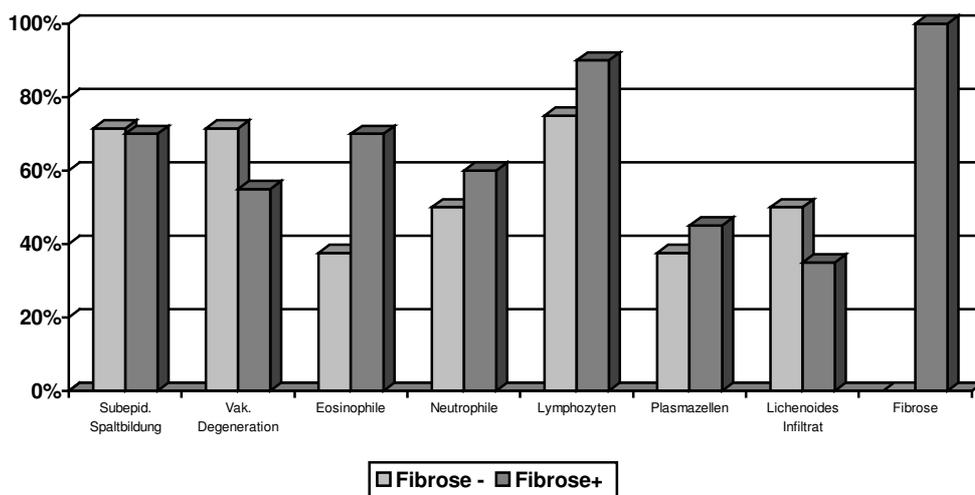


Abb. 35: Vergleich der histologischen Merkmale der Biopsate mit und ohne Nachweis einer Fibrose

Auch hier findet sich parallel zu den Ergebnissen der Biopsate mit Fibrose ein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeiten der Eosinophilen in Bezug zu der Lokalisation. Die höchste Rate der Eosinophilen zeigt sich in Proben aus der MSH. In konjunktivalen Biopsien fehlt sie zu 100 Prozent.

Auf das Merkmal des lichenoiden Entzündungsmusters, das hier gehäuft zu finden ist, gehen wir im nächsten Abschnitt genauer ein.

### 5.3.6.3 Vernarbendes Schleimhautpemphigoid mit lichenoidem Infiltrat

In der Analyse der Histologien fällt wiederholt ein Infiltratmuster auf, das Merkmale einer lichenoiden Entzündungsreaktion aufweist. Hierzu zählen neben dem bandartig, subepidermal lokalisierten, gemischtzelligen Infiltrat auch die vakuolige Degeneration der Basalzellschicht. Dieses Muster findet sich bei 8 unserer untersuchten Patienten in 11 verschiedenen Biopsaten. Abbildung 36 zeigt die Häufigkeitsverteilung der lichenoiden Entzündung in Bezug zur Lokalisation. Auffälligerweise läßt sich dieses Entzündungsmuster nie an den konjunktivalen Biopsien nachweisen und findet sich in 100% der Fälle in den genitalen Biopsaten.

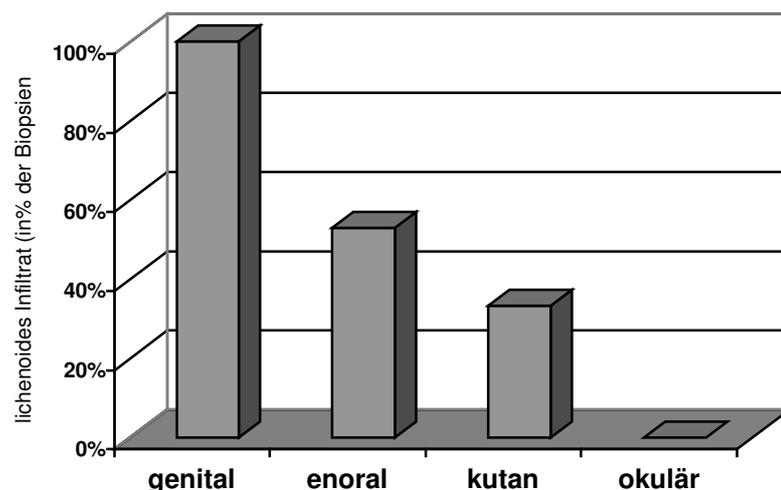


Abb. 36: Das Vorkommen eines lichenoiden Entzündungsmusters in Abhängigkeit von der Lokalisation.

Die folgenden Histologien zeigen das Merkmal der lichenoiden Entzündung anhand von Histologien aus der MSH und der GSH.

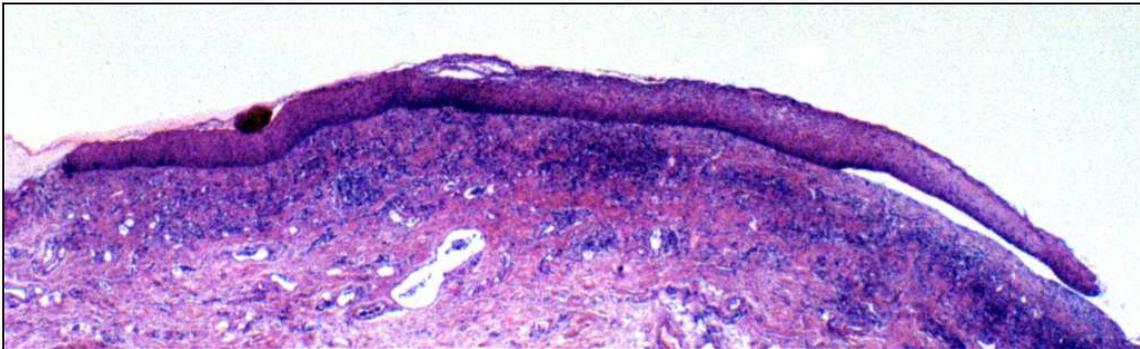


Abb. 37: Lichenoides Entzündungsmuster des VP an der MSH

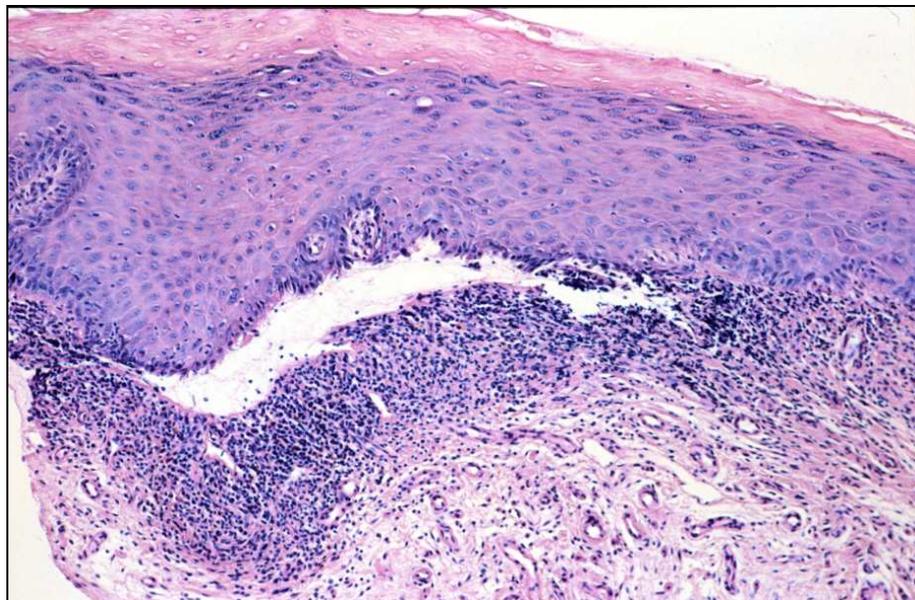


Abb. 38: Lichenoid Variante: Subepidermale Spaltbildung, kräftiges lichenoides Infiltrat.

Nr.	Lokalisation	Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
2	MSH	-	+	-	+	+	+	+	+
2	GSH	+	-	-	+	+	+	+	+
4	MSH	(+)	+	+	-	+	-	+	-
4	GSH	+	+	-	-	+	-	+	-
5	MSH	-	+	+	-	+	-	+	+
6	MSH	+	+	+	+	+	+	+	-
6	GSH	+	+	+	++	+	-	+	+
12	MSH	+	+	+	+	-	++	+	+
13	H	+	+	+	-	++	-	+	+
14	MSH	-	+	-	+	-	-	+	-
24	MSH	+	+	++	-	+	+	+	+

Subepid. Spaltbildung	Vak. Degeneration	Eosinophile	Neutrophile	Lymphozyten	Plasmazellen	Lichenoides Infiltrat	Fibrose
72,7%	91%	63,6%	54,4%	82%	45,5%	100%	63,6%

Tabelle 19: Histologische Merkmale des VP ohne Nachweis eines lichenoiden Entzündungsmusters

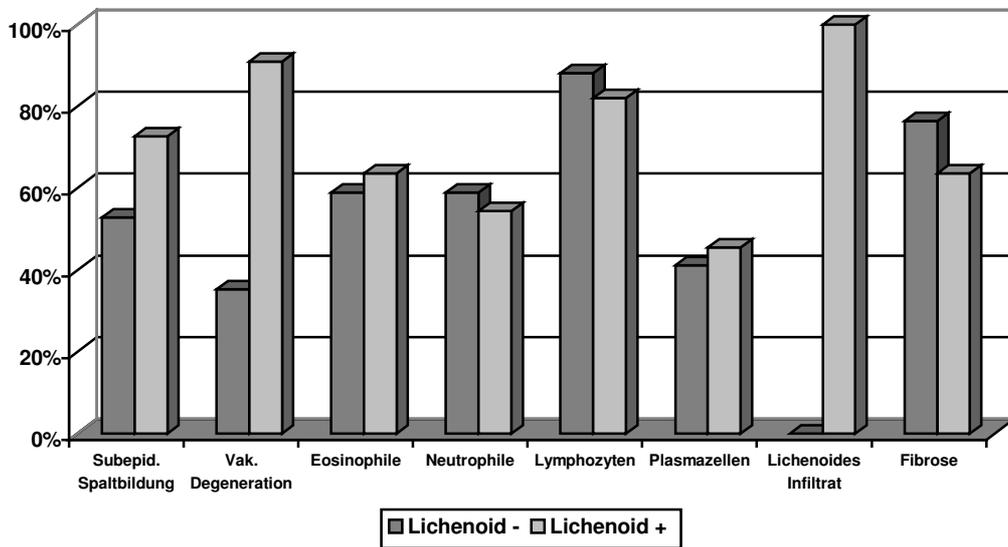


Abb. 39: Häufigkeit der histologischen Merkmale der Biopsate mit lichenoidem Entzündungsmuster

Vergleicht man die Histologien der lichenoiden Varianten mit denen ohne Nachweis einer lichenoiden Komponente, zeigt sich ein deutlich höherer Anteil von subepidermaler Spaltbildung, vakuoliger Degeneration der Basalzellschicht und geringerer Anteil von Nachweisen einer manifesten Fibrose (Abb. 39).

Die Infiltratzusammensetzung differiert kaum von den nicht lichenoiden Varianten.

Bei Patienten mit multiplen Biopsien lässt sich das lichenoides Muster in 3 Fällen parallel sowohl in der GSH als auch in der MSH nachweisen. Bei 2 Patienten mit multiplen Biopsien findet sich dies nur in einer biopsierten Region (Pat. 13 mit MSH und Pat. 14 mit KSH ohne lichenoides Muster).

Hinsichtlich Krankheitsverlauf, Zeitpunkt der Diagnosestellung und Schwere der Erkrankung finden sich keine Unterschiede.

## **5.4 Immunfluoreszenz-Diagnostik**

### **5.4.1 Direkte Immunfluoreszenz**

Die direkte Immunfluoreszenz (DIF) wurde an 25 Biopsaten durchgeführt. Hiervon wurde als Substrat in 11 Fällen normale unbeeinträchtigte Patientenhaut gewählt, in 4 Fällen wurde dies in Spalthauttechnik durchgeführt. In weiteren 7 Fällen erfolgte die direkte Immunfluoreszenz an MSH- und in 4 Fällen an KSH-Biopsaten.

Insgesamt fand sich in 15/25 Fällen eine positive Immunfluoreszenz mit Anti-IgG. Dies entspricht einem Prozentsatz von 60%. Zusätzliche IgA oder IgM-Ablagerungen fanden sich in keinem der untersuchten Fälle. (Tabelle 20)

Nr.	Art	IgG	IgA	IgM
1	H	-	-	-
2	SpH	-	-	-
3	MSH	+	-	-
4	SpH	+	-	-
5	MSH	+	-	-
6	MSH	-	-	-
7	H	-	-	-
8	MSH	-	-	-
9	H	-	-	-
10	H	+	-	-
11	KSH	+	-	-
12	MSH	+	-	-
13	H	+	-	-
14	H	+	-	-
15	H	+	-	-
16	H	-	-	-
17	H	+	-	-
18	H	+	-	-
19	KSH	-	-	-
20	KSH	-	-	-
21	SpH	+	-	-
22	KSH	n.beurt.	n.beurt.	n.beurt.
23	MSH	+	-	-
24	MSH	+	-	-
25	H	+	-	-

Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenz (H: Haut, SpH: Spalthaut, MSH: Mundschleimhaut, KSH: Konjunktivschleimhaut)

Abbildung 40 und 41 zeigen die DIF von Patienten Nr. 11 und 14.

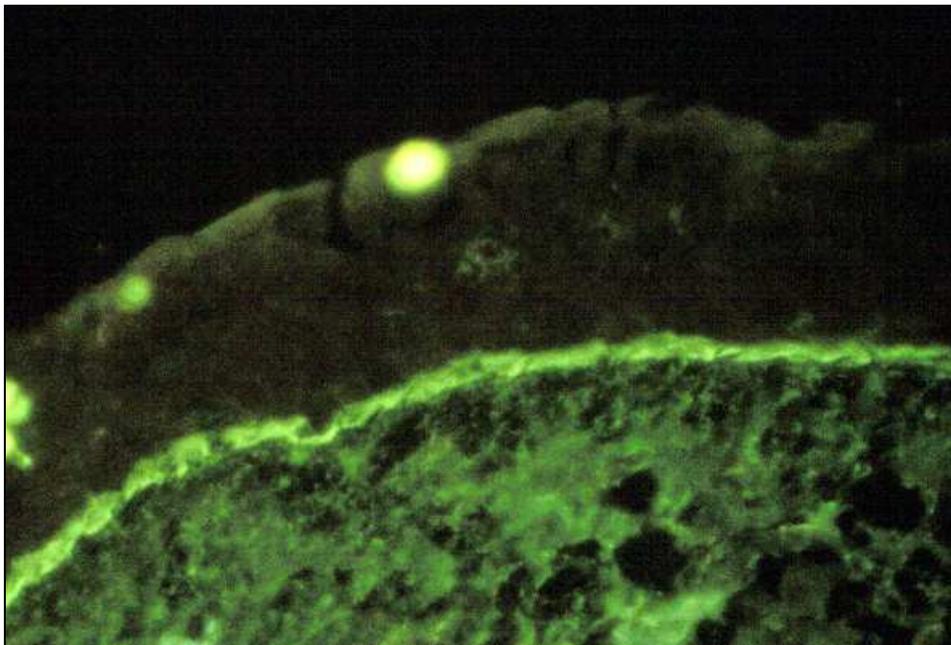


Abb. 40: Positive Fluoreszenz entlang der BMZ in der DIF (Patient Nr. 11)

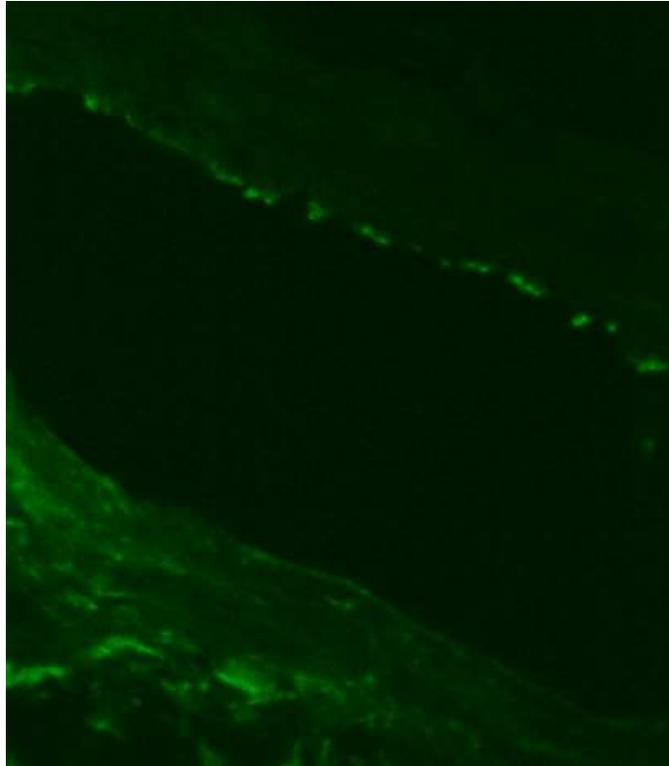


Abb. 41: Positive Fluoreszenz entlang der BMZ am Blasendach in der DIF in Spalthauttechnik (Patient Nr. 14)

Die Ergebnisse der an Spalthaut durchgeführten Untersuchungen zeigten gegenüber der an normaler Haut durchgeführten DIF keine deutlich erhöhte Sensitivität (66% vs. 60% positiven Reaktionen). Auch gegenüber der DIF die an den betroffenen Schleimhautregionen durchgeführt wurde, findet sich kein signifikanter Unterschied (MSH: 71% positive Reaktionen (5/7). An betroffener Konjunktivalschleimhaut fand sich nur in 25% (1/4) eine positive Fluoreszenz.

## 5.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) wurde in 22 Fällen durchgeführt. Bei drei Patienten erfolgte die Bestimmung an unterschiedlichen Substraten (Tabelle 21).

In 40,1% (9/22) der Fälle fand sich eine positive Fluoreszenz an unterschiedlichen Substraten. Die höchste Sensitivität der Substrate fand sich bei humaner Haut (53,8%, 7/13), gefolgt von Affenösophagus (25% 1/4) und Spalthaut (16,7% 1/6). Diese Zahlen sind aufgrund der geringen Fallzahl allerdings statistisch nur eingeschränkt beurteilbar.

Nr.	Art	IgG	IgA	IgM
1	H	-	-	-
2	H	-	-	-
3	AÖ	+	-	-
3	H	-	-	-
4	AÖ/H/SpH	-	-	-
5	H	-	-	-
6	KSH	-	-	-
7	H	+	-	-
7	KSH	-	-	-
8	SpH	+ (Dach+Bod)	-	-
9	KSH	-	-	-
9	SpH	-	-	-
10	H	+	-	-
11	SpH	-	-	-
12	H	-	-	-
13	H	+	-	-
14	H	+	-	-
15	AÖ/H	-	-	-
16	SpH	-	-	-
17	H	+	-	-
18	H	+	-	-
19	H	-	-	-
20	n.d.			
21	AÖ/SpH	-	-	-
22	AÖ	-	-	-
23	H	-	-	-
24	H	-	-	-
25	H	+	-	-

Tabelle 21: Ergebnisse der IIF aus Seren von Patienten mit VP

### 5.4.3 Beurteilung der Immunfluoreszenz-Diagnostik (IF)

DIF +	IIF +	DIF und IIF +
15/25 (60%)	9/22 (40,1%)	7/22 (31,8%)

In der Zusammenschau der beiden immunfluoreszenstechniken ergeben sich bei ca. 32 % der Fälle kongruente Ergebnisse für DIF und IIF. Die höchste Sensitivität besitzt die DIF mit 60% positiven Ergebnissen gegenüber der IIF mit 40% positiven Ergebnissen. Ob hierbei lokalisationsabhängige Faktoren o.ä. einen Einfluss ausüben, haben wir getrennt analysiert.

### 5.4.4 Lokalisation und Immunfluoreszenz-Diagnostik

#### 5.4.4.1 Ausmaß des Schleimhautbefalles

Unterscheidet man die Fälle hinsichtlich Schweregrad der Erkrankung gemessen an der Anzahl der einbezogenen Körperregionen, lassen sich deutliche Unterschiede in den Ergebnissen der DIF und IIF festhalten. So zeigt sich erstaunlicherweise eine negative Korrelation der positiven Immunfluoreszenzergebnisse mit der Anzahl der betroffenen Schleimhautregionen, wie in Abb. 42 dargestellt. Die höchste Sensitivität der DIF mit 70% findet sich bei den Patienten mit nur einer betroffenen Schleimhautregion. Bei der IIF lässt sich diese Korrelation nicht finden.

Klinik	DIF +	IIF +	DIF und IIF +
4 Regionen	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
3 Regionen	2/4 (50%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)
2 Regionen	5/8 (62%)	4/8 (50%)	2/8 (25%)
1 Region	7/10 (70%)	3/8 (37%)	2/10 (20%)

Tabelle 22: Ausmaß des Schleimhautbefalles und IF

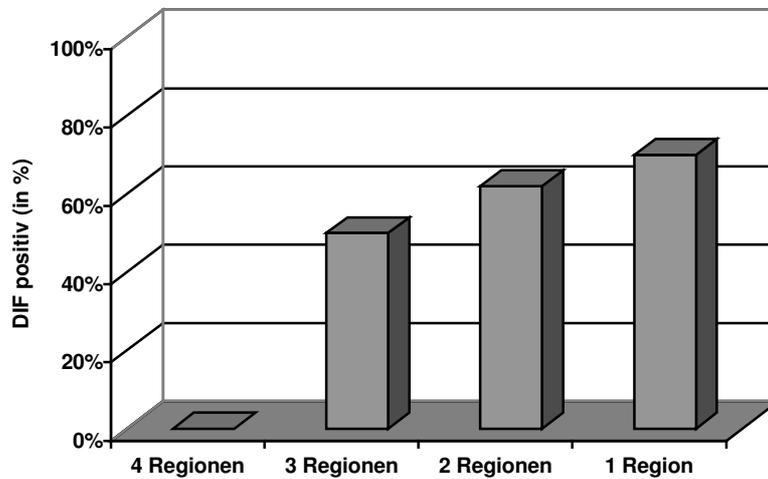


Abb. 42: Negative Korrelation zwischen Ausmaß der SH-Beteiligung und der positiven Ergebnisse der DIF

#### 5.4.4.2 Konjunktivales VP

Bei Analyse der verschiedenen Schleimhautregionen haben wir uns auf die Regionen der KSH und der GSH beschränkt, da nur hier eine ausreichende Anzahl von Untersuchungen vorlag.

Im Falle der okulären VP-Fälle haben wir bezogen auf den reinen Befall der Konjunktiva (POCP) und den konjunktivalen Befall im Rahmen von multilokulärem Schleimhautbefall (OCP) differenziert.

Klinik	DIF +	IIF +	DIF und IIF +
POCP (5/24)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)
OCP (9/24)	5/9 (55%)	4/9 (44%)	2/9 (22%)

Tabelle 23: Okuläres VP und IF (POCP: rein okulärer Befall, OCP: okuläre und andere Regionen betroffen)

Es zeigen sich deutliche Unterschiede für die Ergebnisse der DIF als auch der IIF (Tabelle 23). Die Sensitivität der IF-Untersuchungen ist bei dem reinen okulären CP am niedrigsten und liegt deutlich unter dem der Gesamtheit aller Fälle als auch den den OCP-Fällen (Abb. 43). Hier ergeben DIF und IF kongruente Ergebnisse auf fast identischem Niveau.

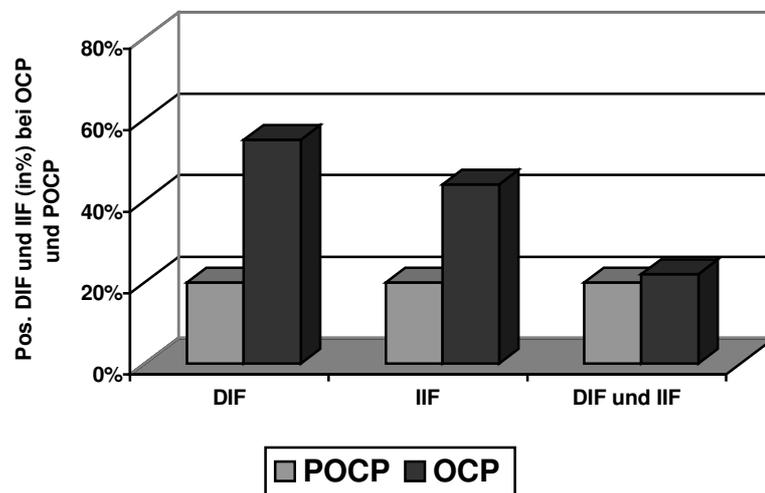


Abb. 43: Ergebnisse der DIF bei OCP und POCP-Patienten

### 5.4.4.3 Enorales vernarbendes Pemphigoid

Auch im Falle der GSH haben wir hinsichtlich des reinen enoralen Befalles (PMSH) und des Befalles im Rahmen eines generalisierten Krankheitsbildes (MSH) unterschieden.

Die Rate der positiven DIF-Ergebnisse liegt für Patienten mit MSH-Befall deutlich über dem Niveau derer mit KSH-Befall. Die höchste Rate findet sich bei Patienten mit reiner MSH-Symptomatik (ca. 84%). In der IIF dreht sich dieses Bild. Hierbei finden wir höhere Raten von positiver Fluoreszenz bei den MSH-Patienten.

Klinik	DIF +	IIF +	DIF und IIF +
PMSH (6/24)	5/6 (83,3%)	1/4(25%)	1/4(25%)
MSH (17/24)	9/14 (64,3%)	5/12 (42%)	3/12 (25%)

Tabelle 24: Enorales VP und IF (PMSH: rein enoraler Befall, MSH: enorale und andere Regionen betroffen)

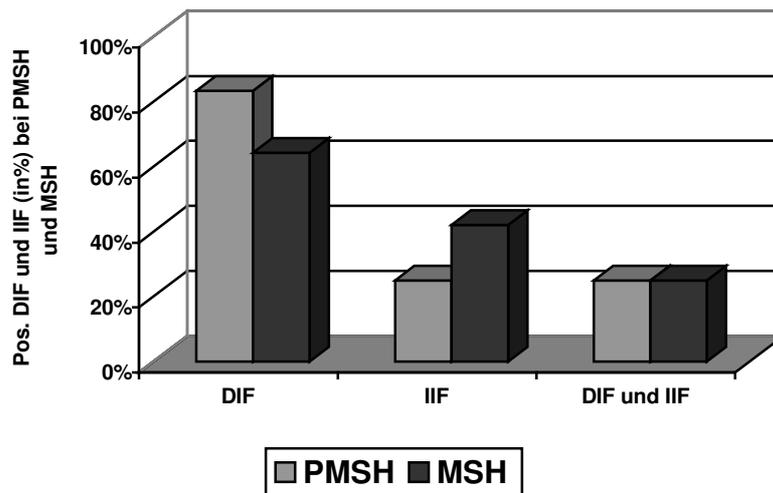


Abb. 44: Enorales VP und IF (PMSH: rein enoraler Befall, MSH: enorale und andere Regionen betroffen)

#### 5.4.4.4 Lichenoides Infiltrat und IF

Die Ergebnisse der IF-Untersuchungen im Falle der Patienten mit der histologischen Variante des lichenoiden Infiltrates sind analog zu der Grundgesamtheit. Ein Unterschied ist nicht nachweisbar.

	<b>DIF +</b>	<b>IIF +</b>	<b>DIF und IIF +</b>
LI (8/24)	6/8 (62,5%)	2/8 (25%)	2/8 (25%)

Tabelle 25: Lichenoider Variante des VP und IF

## 5.5 Blasentypisierung mit Typ-IV-Kollagen-Antikörpern

Die immunhistochemische Darstellung von Kollagen IV am Paraffinschnitt zeigte keine methodischen Schwierigkeiten und führte zu überwiegend guten Anfärbungen des Hauptbestandteiles der Lamina densa. Die Methode konnte an 20 Proben durchgeführt werden. Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse hinsichtlich der Lokalisation des Kollagen IV in Bezug auf die Spaltbildung.

Nr.	Blasendach	Blasenboden
1	n.d.	n.d.
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	n.d.	n.d.
8	n.beurt.	n.beurt.
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	-	+
13	-	+
14	n.d.	n.d.
15	-	+
16	-	+
17	n.d.	n.d.
18	-	+
19	-	+
20	-	+
21	n.d.	n.d.
22	-	+
23	-	+
24	-	+
25	-	+

Tabelle 26: Ergebnisse der Kollagen IV-Darstellung an Biopsaten des VP

In allen 19 auswertbaren Schnitten zeigte sich eine positive Anfärbung des Blasenbodens. Eine Anfärbung des Blasendaches konnte in keinem Fall beobachtet werden. Diese klaren Ergebnisse bestätigen die Lokalisation der Spaltbildung innerhalb der Lamina lucida, da oberhalb der Lamina densa kein Kollagen IV lokalisiert ist. Dieses Mapping der Blase findet sich bei dem VP und dem bullösen Pemphigoid. Eine Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) lässt

sich hierdurch eindeutig abgrenzen, da in diesem Falle aufgrund der sublamina-lucida-Spaltbildung das Kollagen IV am Blasendach dargestellt wäre. Abbildung 45 zeigt die Kollagen IV-Färbung.

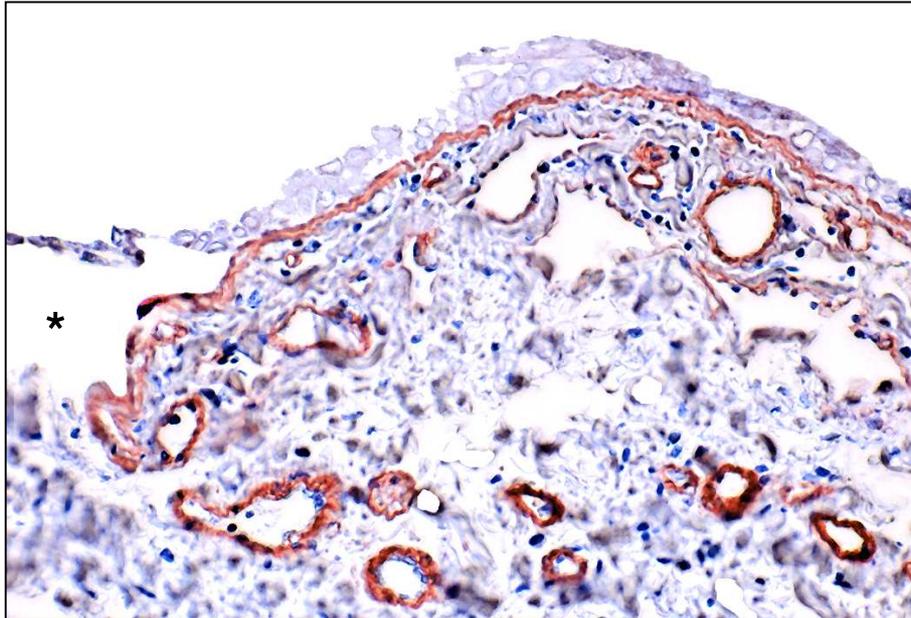


Abb. 45: Typ-IV-Kollagen Darstellung bei VP: Nachweis des Typ IV-Kollagen am Blasenboden. ( \* im Blasenlumen)

Die Wertigkeit der Blasentypisierung mit Kollagen-Typ-IV-Antikörpern kann anhand des Patienten Nr. 25 dargestellt werden. Die Histologie, DIF und IIF zeigt eine subepidermale Blasenbildung mit Fluoreszenz am Blasenboden. Dieses dermale Fluoreszenzmuster deutet auf eine EBA hin. In der parallel durchgeführten Kollagen IV Färbung zeigt sich allerdings eine Anfärbung des Blasenbodens. Diese findet sich allerdings nur bei einem Kohärenzverlust in der Lamina lucida entsprechend dem VP oder BP.

## 6. Diskussion

Das VP ist eine häufig schwere, chronisch verlaufende Erkrankung von Haut und Schleimhäuten, die immunologisch durch zirkulierende Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle der dermo-epidermalen Junktionszone charakterisiert ist (7, 8, 9).

Vergleichende Untersuchungen histologischer und immunhistologischer Natur hinsichtlich unterschiedlicher betroffener Schleimhautregionen fehlen weitgehend. Die Klinik und der Schweregrad der klinischen Veränderungen unterscheidet sich nach Lokalisation des Schleimhautbefalles z.T. sehr deutlich. Ein Beispiel hierfür ist die Tatsache, dass der Befall der Mundschleimhaut, die sehr häufig im Rahmen des VP betroffen ist, nur in seltenen Fällen zu einer deutlichen Funktionseinschränkung durch Vernarbung führt. Im Gegensatz hierzu steht das konjunktivale VP mit deutlicher Fibroseneigung und Vernarbung mit konsekutiver Funktionseinschränkung des Organs (7,9,106).

In unseren Untersuchungen konnten wir einzelne Unterschiede in der Histologie und Immunfluoreszenz des VP je nach Lokalisation feststellen. Diese werden wir im Folgenden diskutieren und überprüfen, ob sich hieraus Hinweise auf unterschiedlich pathogenetische Prozesse innerhalb dieser Gruppen ergeben.

Des Weiteren werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Blasentypisierung mit Kollagen-Typ-IV-Antikörpern im Falle des VP vorgestellt und der Frage nachgegangen, ob diese Methode eine neue zusätzlich Relevanz in der Differenzialdiagnostik besitzt.

## 6.1 Die Histologie des VP in Abhängigkeit der betroffenen Lokalisation

Wie aus unseren Ergebnissen ersichtlich wird, liegt bei den meisten untersuchten Patienten ein multilokulärer Schleimhautbefall vor. Der eindeutig häufigste Manifestationsort ist die MSH, gefolgt von der KSH. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den Daten in der Literatur (6, 7). In verschiedenen Untersuchungen konnte die MSH beim VP in 84-96% als Hauptmanifestationsort bestimmt werden (7, 25, 26). Häufig beginnt hier auch die Erstmanifestation der Erkrankung in Fällen von späterem multilokulärem Befall (8). Klinisch zeigt sich ein relativ unspezifisches Bild mit schmerzhaften Erythemen und Ulzerationen wie im klinischen Bildteil dargestellt. Auch in der Literatur werden nur selten intakte Blasen beschrieben (25,26). Eine ausgeprägte Vernarbung findet sich in der MSH kaum. Auffälligerweise finden sich eine Reihe von Patienten, die im Rahmen ihres VP MSH Veränderungen zeigen, die klinisch denen eines Lichen ruber mucosus ähneln. Auf diese Beobachtung wird im Weiteren noch genauer eingegangen.

Im Gegensatz zum MSH-Befall findet sich beim okulären Befall, gleich ob im Rahmen des rein okulären oder eines multilokulären Befalles, ein deutlich unterschiedliches Bild (30). Diese, nach unseren Ergebnissen zweithäufigste Manifestationsform des VP, zeigt eine unterschiedliche klinische Symptomatik. Es finden sich wesentlich häufiger und schneller Vernarbungsprozesse, die zu einer raschen Funktionseinschränkung aufgrund von Synechien und Hornhauttrübungen führen (34). Dies wird durch die Stadieneinteilung nach Tauber unterstrichen (32).

Bei diesen klinisch unterschiedlichen Manifestationsformen des postulierten gleichen Krankheitsprozesses stellt sich die Frage nach den histologischen Charakteristika des entzündlichen Geschehens. Dies ist bisher in der Literatur wenig oder nicht vergleichend untersucht worden (1, 15, 45, 46, 48). Bisherige Untersuchungen fokussierten sich zumeist auf ein Organgebiet. Auch aufgrund

der eingeschränkten diagnostischen Wertigkeit der histologischen Befunde ergibt sich hier eine relative Datenlücke.

Unterschiede der histologischen Charakteristika der verschiedenen Schleimhautregionen sind, wie im Ergebnissteil dargestellt, auch durchaus nachweisbar. Zwar findet sich ein vergleichbares histologisches Grundmuster in allen Biopsien, das durch eventuelle Spaltbildung, vakuolige Degeneration der Basalzellschicht, einem gemischförmigen lymphozytären, granulozytären Infiltrat und einer fibrotischen Aktivität charakterisiert wird, doch lassen sich einzelne Unterschiede in der Ausprägung und Häufigkeit der Parameter darstellen. Die markantesten Unterschiede zeigen sich in der Ausprägung des eosinophilen Infiltrates, des Ausmaßes der Fibrose und dem Vorhandensein eines lichenoiden Musters in dem entzündlichen Infiltrat.

Die Biopsien ,entnommen aus der MSH, weisen ein deutlich häufigeres Vorkommen von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten im entzündlichen Infiltrat in der oberen Dermis auf im Vergleich zu den Biopsien der KSH. Dieser indirekte Hinweis auf eine erhöhte entzündliche Aktivität, insbesondere der eosinophilen Granulozyten im Bereich der MSH, erscheint zunächst ungewöhnlich. Die erhöhte entzündliche Aktivität der zellulären Elemente und der gesteigerten Expression von Zytokinen und Mediatoren der Entzündungskaskade führt nachweislich zu einer gesteigerten Aktivität der dermalen Fibroblasten mit konsekutiver Fibrose durch übersteigerte Produktion von Kollagen I und III (96-99, 110). Die Fibrose ist allerdings in den MSH-Biopsien (57%) deutlich weniger stark ausgeprägt als in den KSH-Biopsien (71%). Dies korreliert auch gut mit den klinischen Befunden, da bei MSH-Befall eine klinisch fassbare Vernarbung ein relativ seltenes Phänomen ist und Vernarbung der KSH, wie oben dargestellt, eine der häufigsten Komplikationen des okulären VP dargestellt (34). Dieser scheinbare Widerspruch ist zum Teil durch unterschiedliche zeitliche Abläufe der entzündlichen Vorgänge erklärbar. Wie am okulären VP gezeigt werden konnte, finden sich stadienabhängig signifikante Unterschiede in der Nachweisbarkeit von eosinophilen

Granulozyten und deren Proteine, wie das eosinophile kationische Protein (ECP) und deren Subtypen (EG1 und EG2), sowie der neutrophilen Granulozyten und der CD45+ Lymphozyten in Biopsien der KSH (95). Die Infiltratdichte und der Nachweis eosinophiler Proteine und relevanter Zytokine ist in subakuten Krankheitsphasen deutlich höher als in chronischen Krankheitsphasen. Im chronischen, fibrotischem Stadium finden sich im Infiltrat von chronischem VP keine Eosinophilen mehr. Die Biopsien der KSH werden zum größten Teil erst in späteren Stadien des VP entnommen, so auch bei unseren Patienten.

Diese Feststellung korreliert auch mit unseren Daten. Nur bei Patient 2 (1/7) zeigten sich eosinophile Granulozyten in der Histologie und nur eine angedeutete Fibrose, bei den sechs weiteren Patienten konnten keine eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden, aber eine ausgeprägte Fibrose.

Die Dichte des mononuklären Infiltrates, die Sekretion des ECP und der Nachweis von IL-5 und Eotaxin korrelieren gut mit der entzündlichen Aktivität des bullösen Pemphigoides (93, 111, 112). Die proteolytische Aktivität der eosinophilen Proteine scheinen ein Hauptfaktor in der Entstehung der Gewebszerstörung und der Blasenbildung zu sein (68). Nach Degranulation des eosinophilen Granulozyten mit Sezernierung der granulären Proteine wie dem ECP, EPX/EDN, MBP und der eosinophilen Peroxidase erfolgt eine toxische Gewebsreaktion (95). Daneben erfolgt eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten und eine Histamin-Liberation der basophilen Granulozyten und Mastzellen. Erfolgt eine Degranulation, ist der eosinophile Granulozyt im Gewebe mit histologischen Techniken nicht mehr sicher nachweisbar. Nur mittels immunhistochemischer Techniken oder der Immunelektronenmikroskopie lassen sich in diesem Entzündungsstadium die Enzyme und Proteine im Gewebe nachweisen (113). Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle des eosinophilen Granulozyten in der Mediierung von entzündlichen Prozessen. Die Rolle der nachweisbaren Zytokine im Entzündungsprozeß bleibt zur Zeit noch hypothetisch. So finden sich in einer vergleichenden Untersuchung VP

und BP-Patienten kein signifikanter Unterschied des Zytokinmusters hinsichtlich IL-4, IL-5 und IFN-gamma (114). Einzig eine erhöhte Expression von TGFbeta1 war nachweisbar. In einem Vergleich zwischen normaler Konjunktiva und verschiedenen Entzündungsphasen des OCP konnte in einer ähnlichen Untersuchung ebenfalls nur ein Unterschied in der TGFbeta Expression zwischen gesunder und erkrankter Schleimhaut nachgewiesen werden. Für alle anderen untersuchten Zytokine (IL-2, IFNgamma, PDGF, bFGF, TNFalpha) konnte kein Unterschied objektiviert werden (115). Eine signifikante Erhöhung von TGFbeta 1 und 3 in akut entzündlichen Phasen des OCP konnte auch von anderer Seite her nachgewiesen werden. Auch in dieser Studie konnte kein Unterschied in der Expression von PDGF und FGF nachgewiesen werden (98). Auch die Rolle des IL-4 stellt sich inhomogen dar. Razzaque et al konnten eine erhöhte Expression in OCP-Patienten gegenüber gesunden Probanden nachweisen (102), wohingegen Caproni nur in 4 von 14 OCP Patienten eine IL-4 Erhöhung feststellen konnte (114). Möglicherweise spielt die Expression von mCSF eine weitere Rolle in der entzündlichen Kaskade die letztlich zur Fibrosierung führt (103). Ein erschöpfendes Konzept für die Überexpression der Kollagene im Rahmen der Fibrosierung lässt sich allein durch die Zytokinmuster bei dem VP noch nicht aufstellen.

Auch wie sich die deutlichen Unterschiede in der Dichte des eosinophilen Infiltrates der MSH im Vergleich zur KSH bei gleichem Krankheitsstadium und bei gleichen Individuen erklären lässt, ist zur Zeit noch unklar.

Es wird schon seit längerem diskutiert, ob es sich bei dem rein okulären VP (POCP) um einen Subtyp des VP oder gar eine eigene Entität handelt (23, 116, 117). Als Argumente hierfür werden der klinische Verlauf des reinen okulären VP, die signifikant erhöhte Frequenz von bestimmten HLA-Allelen (23) bei dem POCP, die Unterschiede in dem Nachweis von IgG in der DIF und insbesondere die negativen Befunde in der IIF (116, 117) herangezogen. Daneben zeigt sich im Vergleich zu Patienten mit OCP, die multilokulären Schleimhautbefall aufweisen, eine deutlich niedrigere serologische Aktivität gegenüber dem BP-Ag im Immunoblot (117).

In unseren Fällen konnten histologisch keine signifikanten Unterschiede zwischen POCP und OCP Biopsien nachgewiesen werden. Es sind allerdings tendenzielle Unterschiede vorhanden, die aber aufgrund der Fallzahl mit Zurückhaltung zu interpretieren sind. Es bleibt hier anzumerken, dass der einzige Patient mit Nachweis von Eosinophilen ein OCP Patient war. Bei keinem POCP Biopsat ließen sich dagegen Eosinophile nachweisen. Auch findet sich in allen OCP- Biopsaten eine vakuolige Degeneration und Fibrose als Merkmal. Bei POCP-Biopsaten nur in 50% der Fälle.

Auf die nachweisbaren Unterschiede im Immunfluoreszenz-Verhalten der beiden Gruppen gehen wir im Kapitel 6.4 ein.

Die Histologie des VP der Genitalschleimhaut ist durch das Vorkommen eines lichenoiden Musters des entzündlichen infiltrates gekennzeichnet. Dies korreliert gut mit dem klinisch Aspekt der Genitalläsionen. Häufig zeigt sich hier ein Bild, das von einem genitalen Lichen ruber mucosus oder Lichen sclerosus nicht eindeutig zu differenzieren ist (siehe 5.2.2.3) (118). Die lichenoiden Variante des VP werden wir unter 6.3 gesondert behandeln.

Zusammenfassend können wir folgende Aussage über die lokalisationsabhängigen Merkmale des VP treffen:

- Gemeinsame Merkmale, unabhängig von der Lokalisation, sind: vakuolige Degeneration, Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen im Infiltrat und Nachweis von Fibrose.
- Charakteristika für die Histologie der KSH sind das fast komplette Fehlen von Eosinophilen im Infiltrat, eine stärker ausgebildete Fibrose und der deutlich geringere Nachweis einer subepidermalen Spaltbildung. Ein lichenoides Infiltrat lässt sich nicht nachweisen.
- Die Histologie der MSH ist charakterisiert durch das deutliche Überwiegen eines Infiltrates mit eosinophilen Granulozyten in Verbindung mit leichter Fibrose.

- In der Genitalschleimhaut lässt sich häufig eine subepidermale Spaltbildung und ein lichenoides Infiltrat nachweisen.

## **6.2 Das Merkmal der Fibrose in der Histologie des VP**

Überschießende Fibrose als Folge eines entzündlichen Prozesses führt zur klinisch sichtbaren Vernarbung, dem Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen VP und BP. Insbesondere an der Konjunktivalschleimhaut ist diese verantwortlich für Funktionseinschränkung des Organes Auge und somit für das Leiden der Patienten.

Ursächlich für die Initiierung der fibrotischen Prozesse sind die Art und die Lokalisation des vorangehenden Entzündungsgeschehens und die Aktivität der Fibroblasten (119). Die Bindung des Autoantikörpers an dem entsprechenden Protein der dermo-epidermalen Junktionszone allein induziert unter Umständen einen Kohärenzverlust, d.h. eine Blase, verursacht aber nicht die Fibrosierung des Gewebes (68, 78, 79). Auch der exakte Ort des Zielproteins und die Nähe zur Lamina densa allein ist nicht ausschlaggebend für die Vernarbung (82). Auch die Tatsache der Heterogenität der Autoantikörper des VP (BPAg2, Laminin 5, etc.) bei identischer Klinik spricht hiergegen. Andere Faktoren müssen somit für die Art und Weise des Entzündungsgeschehens, wie z.B. zelluläre Elemente, Zytokine und Mediatoren oder die Fibroblastenaktivität, verantwortlich sein.

Die Beziehung des eosinophilen Granulozyten, seiner Proteine und proteolytischen Enzyme und der fibrotischen Aktivität von Entzündungsprozessen ist in zahlreichen Untersuchungen zur Wundheilung, z.B. bei der systemischen Sklerodermie und der eosinophilen Fasciitis, ausführlich dargestellt worden (96-98). Analog diesen Vorgängen wird die fibrosierende Potenz einer anfänglich stark durch den eosinophilen

Granulozyten bestimmte Entzündungsreaktion an der dermo-epidermalen Grenzzone im Rahmen des bullösen Pemphigoids und des VP diskutiert (95). Im Rahmen der KSH scheint diese Eosinophilie stadienabhängig zu sein, d.h. dass nur in akuten entzündlichen Schüben eosinophile Granulozyten in der Schleimhaut nachweisbar sind. Später, nach Degranulation, ist der Eosinophile als Zelle in Färbungen nicht mehr identifizierbar, wohl aber dessen granuläre Proteine und Zytokine (95).

Hieraus ist ersichtlich, dass in Proben, die in späteren Krankheitsstadien entnommen werden, wie dies in der überwiegenden Anzahl unserer Patienten mit okulärem Befall der Fall ist, keine erhöhte Rate von eosinophilen Granulozyten und eine deutlich stärker ausgebildete Fibrose nachweisbar ist. Aus verschiedenen klinisch relevanten Gründen (sekundäre Traumatisierung, Folgekomplikationen etc.) werden Biopsien aus der KSH meist erst in späteren Krankheitsstadien entnommen. Bei Proben in der MSH weisen wir deutlich mehr eosinophile Granulozyten nach.

Allerdings scheinen bei der relativ schwächer ausgeprägten Fibrose mit relativer Eosinophilie der MSH noch andere Faktoren bei der Entstehung der Fibrose eine Rolle zu spielen. In der Literatur finden sich kaum Patienten mit Vernarbungen im Mundschleimhautbereich, die klinisch zum Funktionsverlust geführt haben. Das Phänomen der Vernarbung ist bei oralem Befall des VP eher selten (120, 121). In einigen publizierten Fällen kam es zur Abheilung der Hautveränderungen ohne Rezidiv in der Nachbeobachtungszeit (20). Desweiteren waren auch in unserem Patientenkollektiv Patienten zu finden, die in der Vorgeschichte eine Desquamative Gingivitis/VP der MSH aufwiesen, die aber zum Zeitpunkt der Untersuchung im Rahmen anderer betroffener Schleimhäute komplett abgeheilt waren. Auch das gute Ansprechen auf lokale Therapien(121) bei MSH-Veränderungen im Gegensatz zu KSH-Veränderungen deuten auf andere Ko-Faktoren bei der Fibroseentstehung hin. Neben dem möglicherweise unterschiedlichen immungenetischen Hintergrund (HLA-Muster) (24) fehlen vergleichende Untersuchungen bezgl. der Stimulierbarkeit/Aktivierbarkeit von enoralen, konjunktivalen und kutanen Fibroblasten bei Patienten mit VP. Bisherige Untersuchungen fokussieren sich

auf das okuläre VP, das mit einem deutlich erhöhtem Vernarbungsrisiko einhergeht.

Der molekularbiologische Prozeß der konjunktivalen Fibrose ist bisher nur zum Teil bekannt. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die erste Phase der Fibrose am ehesten Zytokin-mediiert ist (103). Potentielle Zytokine sind hierbei TGF beta 1-3, m-CSF, PDGF und FGF (98-104). Ursprung der Zytokine sind zum einen inflammatorische Zellen des Infiltrats, wie Lymphozyten, Eosinophile, Neutrophile und Mastzellen, zum anderen auch zelluläre Elemente der Konjunktiva wie lokale Fibroblasten (123). Interessanterweise zeigt sich in in-situ-Hybridisierungsversuchen eine gegenüber Kontrollen deutlich erhöhte mRNA-Expression von TGF beta1 und 3 nur in der akuten entzündlichen Phase des konjunktivalen VP (98). TGF beta2, PDGF und FGF zeigten sich kaum erhöht. In der chronischen Phase des VP fanden sich durchweg normale Werte für diese Zytokine. Dies korrespondiert zu den unterschiedlich ausgeprägten histologischen Nachweisen des entzündlichen Infiltrates in den verschiedenen Stadien des Erkrankungsprozesses.

Die zentrale Rolle des Fibroblasten im Vernarbungsprozeß wird auch durch Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten von Biopsaten von VP unterstützt. Es findet sich eine signifikant erhöhte Proliferationsrate gegenüber kultivierten Kontrollfibroblasten in vitro und ein erhöhter Nachweis von Kollagen III und IV in vivo (110, 123). Diese Hyperproliferation, bzw. aberrante Kollagenproduktion führt zu einer gesteigerten Fibrose des Gewebes. Diese Fähigkeit der konjunktivalen Fibroblasten bleibt allerdings auch in der chronischen Phase des progressiven okulären VP ohne Erhöhung der Zytokine nachweisbar (123). Hieraus bleibt zu vermuten, dass der abnormal proliferierende konjunktivale Fibroblast noch anderen Steuerungseinflüssen unterliegt.

In diesem Zusammenhang sind aktuelle Ergebnisse zum Zytokinmuster in vergleichenden Untersuchungen von VP und dem nicht vernarbenden BP zu sehen (114). Hierbei fand sich in Biopsien von Patienten mit VP und BP anhand der Messung der mRNA-Expression von IL-4, IL-5, TGF-beta und IFN-

gamma fast identische Ergebnisse. Da bei beiden Erkrankungen die Lokalisation des dermo-epidermalen Kohärenzverlustes nahezu identisch ist, müssen weitere Faktoren postuliert werden, die die Fibrose im Rahmen des VP induzieren.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass der Fibroblast nicht nur Ursprung der Fibrose ist, sondern auch zur Perpetuierung des entzündlichen Prozesses beitragen kann. So konnte auch an isolierten Fibroblasten aus Biopsien von konjunktivalen VP eine erhöhte Expression von m-CSF (macrophage colony stimulating factor) nachgewiesen werden (103). Dies korreliert sehr gut mit der Infiltratdichte von aktivierten Makrophagen in der entsprechenden Biopsie.

Daneben bleibt offen, ob nur der Entnahmezeitpunkt im Bezug zur Krankheitsphase des VP bestimmend für die histologischen Unterschiede in Fibrose und entzündlichem Infiltrat hinsichtlich der Schleimhautregion ist. Nachweislich ist der Prozess der Fibrose abhängig von Art und Dauer der einwirkenden Noxe und auch von dem Zielgewebe und dessen regenerativen Fähigkeiten der Fibroblasten und der extrazellulären Matrix (119). Leider existieren bisher keine kontrollierten, vergleichenden Untersuchungen über die Fibroblastenaktivität aus verschiedenen Lokalisationen im Rahmen des VP.

Bei unseren beiden Patienten, die zeitgleich Hautveränderungen im Bereich der Konjunktiva und der Mundschleimhaut aufwiesen und von denen auch Biopsien aus beiden Lokalisationen vorliegen, zeigten die Histologien auch kein monomorphes Bild. So fand sich bei Patient Nr. 14 eine Fibrose ohne Eosinophilie in der KSH-Biopsie, allerdings keine Fibrose in der MSH-Biopsie. Anamnestisch wurden beide Lokalisationen gleichzeitig betroffen. Es zeigt sich also schneller die Entwicklung einer Fibrose im Bereich der KSH. Bei Patient Nr. 2 zeigte die KSH-Biopsie das Bild eines akuten okulären Pemphigoids mit Nachweis von Eosinophilen im Infiltrat und nur leichter Fibrose. Die korrespondierende MSH-Biopsie wies eher Merkmale eines chronischen VP ohne Eosinophilie und mit Fibrose auf. Anamnestisch traten hier die

Veränderungen im Bereich der MSH lange vor denen der Konjunktiva auf. Wie aus diesen beiden Fällen ersichtlich wird, spielt nicht nur der Zeitpunkt der Biopsie und somit das klinische Stadium der Erkrankung eine Rolle für den Nachweis der Fibrose und der Eosinophilie, sondern auch die Lokalisation der Biopsie.

### **6.3 Die Histologie der lichenoiden Variante des VP**

Das Merkmal des lichenoiden Infiltratmusters findet bisher in der Literatur kaum Beachtung, dessen Existenz wird aber gelegentlich angedeutet (49). Erstmalig größere Beachtung wurde diesem Merkmal durch Megahed zuteil, auch wenn eine systematische Untersuchung bisher fehlt (6).

In unseren untersuchten Biopsaten fand sich durchaus ein Infiltratmuster, das dem eines lichenoiden entspricht. Neben dem bandartigen, subepidermalen Entzündungsinfiltrat zeigt sich eine vakuolige Degeneration der Basalzellschicht der Epidermis.

Diese lichenoiden Variante ist durch die nachweisbare Spaltbildung, die positive Immunfluoreszenz und die Klinik vom Lichen ruber abgrenzbar.

Schwierigkeiten kann die Abgrenzung zum Lichen planus pemphigoides (LPP) machen, da auch hier eine positive Immunfluoreszenz von linearen IgG und C3 nachweisbar ist (124, 125). Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Lichen planus pemphigoides um eine heterogene Variante des bullösen Pemphigoids mit Autoantikörperbildung gegen das BP-180-Ag, dem klinisch lichenoiden Hautveränderungen vorausgehen oder parallel bestehen können (126). In neueren Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass Antikörper des LPP gegen das NC16A-Epitop (MCW-4) des BP180-Ag gerichtet sind (127). Hierin scheint zunächst ein Unterschied zu den Epitopen des bullösen Pemphigoides und des CP zu bestehen. Das kontrovers diskutierte

Krankheitsbild des LPP scheint zudem heterogener zu sein als bisher vermutet. Auch bei identischen klinischen, histologischen und immunfluoreszenz-chemischen Befunden lassen sich die Ablagerung von Antikörpern in immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen an verschiedenen Lokalisationen, die denen von CP, BP und sogar EBA entsprechen, finden (125). Es scheint somit nicht unwahrscheinlich, dass der LPP ein Epiphänomen im Rahmen von chronischen, blasenbildenden Autoimmunerkrankungen unterschiedlicher Genese zu sein scheint. Es ist allerdings auch denkbar, dass zunächst durch eine vorangehende lichenoiden Entzündung (LPP) eine humorale Autoimmunantwort auf das BPAg2 induziert wird. Ob sich das lichenoiden Zellinfiltrat gegen dasselbe Epitop wie die Antikörper richtet, ist nicht bekannt (3).

Bei gleichzeitiger Existenz von VP-typischen klinischen Befunden, der Abwesenheit von LR-artigen Effloreszenzen und typischen Histologien, lässt sich eine Abgrenzung wie in unseren 8 Fällen allerdings durchaus vollziehen.

Auffälligerweise konnten wir das Infiltratmuster der lichenoiden Variante bei allen 3 Biopsien der GSH und bei keiner der 7 KSH nachweisen. Bei enoralen Biopsien konnte dies immerhin in 50% der Fälle nachgewiesen werden. Das lässt daraufhin schließen, dass dieses Entzündungsmuster durchaus häufiger als bisher vermutet existiert. In der bisherigen Literatur ist die lichenoiden Variante unterrepräsentiert.

Die Zusammensetzung des Infiltrates zeigt keinerlei Unterschied zu den Biopsien ohne lichenoiden Anordnung. Es zeigt typischerweise eine Eosinophilie, die die Abgrenzung zum Lichen planus unterstreicht. Als weitere Merkmale findet sich die vakuolige Degeneration der Basalzellschicht, eine erhöhte Rate einer manifesten Spaltbildung und einer geringeren Rate der Fibrosierung. Ob es sich hierbei um Ausdruck einer gewissen Stadienabhängigkeit des lichenoiden Musters handeln könnte, ist nicht sicher auszuschließen. Allerdings ergibt sich aus unseren Daten hierfür kein Anhalt,

da sich zur Grundgesamtheit kein Unterschied in Bezug Erkrankungszeitpunkt oder Schweregrad des CP finden lassen konnte.

Warum die lichenoiden Entzündung sich nie in der KSH, unabhängig davon, ob es sich hierbei als Teilsymptom eines multilokulären oder monosymptomatischen okulären CP handelt, allerdings zu 100% in der GSH, finden lässt, ist letztlich nicht sicher zu erklären. Es liegt nahe, dass hierbei lokalisationsabhängige Verteilungen oder Expressionen von Antigenen oder Entzündungsmediatoren verantwortlich sind.

Zusammenfassend können wir folgende Aussagen zu der lichenoiden Variante des VP treffen:

- Es findet sich nie bei okulärem VP
- Es findet sich wahrscheinlich durchgängig bei genitalem VP
- Es findet sich bei monolokulärem als auch bei multilokulären Befall des VP
- Es besteht keine Korrelation zu Schweregrad, Zeitpunkt und Verlauf des VP

#### **6.4 Der diagnostische Wert der Immunfluoreszenzdiagnostik**

Die Technik der Immunfluoreszenzuntersuchung ist zentraler Bestandteil in der Diagnostik und Differentialdiagnostik der bullösen Autoimmunerkrankungen (106). Insbesondere in der Unterscheidung von epidermaler zu subepidermaler Spaltbildung, d.h. der Abgrenzung von Erkrankungen der Pemphigusgruppe zu denen der Pemphigoidgruppe, liefert sie bei unklarer Klinik oder Histologie die entscheidenden Informationen.

Beim BP, dem VP und der Epidermolysis bullosa acquisita findet sich in der direkten Immunfluoreszenz (DIF) eine lineare Ablagerung von IgG und C3

(106). Dies ist das Korrelat für die Bindung der gewebegebundenen Autoantikörper vom Typ IgG an den entsprechenden Zielautoantigenen. In der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) erfolgt der Nachweis zirkulierender Autoantikörper aus dem Patientenserum durch Bindung an standardisierte Zielgewebe wie Affenösophagus oder humaner Haut (106). Eine Verfeinerung dieser Technik stellt die Salt-Split-Technik (SST) dar (siehe Kap.1.8.3). Hierbei wird durch artifizielle Spaltbildung des Zielgewebes an der Lamina lucida der BMZ ein Mapping der Bindungsstelle der Autoantikörper ermöglicht (59). Eine Unterscheidung von EBA zu dem Pemphigoid wird hiermit immunserologisch überhaupt erst ermöglicht. Eine Übersicht der wichtigsten Immunfluoreszenzbefunde in der Literatur zeigt Tabelle 27.

	DIF			IIF		
	AK	Ergebnisse	Muster	Affenösophagus	SST	Muster
<b>VP</b>	IgG	67-100%	Linear BMZ	5-25%	50-80%	Epidermal/dermal
<b>BP</b>	IgG	100%	Linear BMZ	70%	90%	Epidermal
<b>EBA</b>	IgG	100%	Linear BMZ	50%	50%	dermal

Tabelle 27: Immunfluoreszenzmuster bei blasenbildenden subepidermalen Autoimmunerkrankungen (VP, BP, EBA), nach (7)

Es existieren wenige inhomogene Untersuchungen der immunserologischen Befunde im Rahmen des VP (36, 52, 57, 58, 69, 128). Im Folgenden geben wir eine Übersicht über die wesentlichen Immunfluoreszenzuntersuchungen in der bisher veröffentlichten Literatur (Tabelle 28).

<b>Autor</b>	<b>n</b>	<b>DIF +</b>	<b>Substrat DIF</b>	<b>IIF +</b>	<b>Besonderheit</b>
Murakami et al (1998) (57)	50	n.d.	-	38%	SST
Ghohestani (1997) (36)	23	n.d.	-	87%	SST
Setterfield (1999) (69)	63	89%	MSH, H	91%	SST
Fine et al (1984) (52)	10	80%	MSH	-	
Fine et al	8	-		12,5%	
Demers (1998) (128)	15	67%	KSH	n.d.	Nur OCP SST, C3 als pos. gewertet
Kelly (1988) (58)	8	n.d.	-	88%	SSS (bei AÖ 13% pos. IIF)
Laskaris (1981) (53)	33	96,9%	MSH	36,4%	-

Tabelle 28: IF im Rahmen des VP: Übersicht der wichtigsten Ergebnisse in der Literatur

Die Ergebnisse der DIF schwanken zwischen 67 und 100%, wobei anzumerken ist, dass in der Studie von Demers (67%) auch der positive Nachweis von C3 ohne gleichzeitigen Nachweis von IgG als positiv gewertet worden ist (128). Wertet man nur die IgG-Nachweise als positive DIF, ergäbe sich hier eine Sensitivität von nur 40%.

Aufgrund unterschiedlicher Verfahren, Patienten und untersuchter Gewebebiopsien oder Lokalisationen sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt untereinander vergleichbar.

Das Fluoreszenzmuster der DIF beim VP ist in allen Fällen ein homogenes, lineares Band entlang der BMZ. Der Nachweis von IgA ist etwas häufiger als bei dem BP, der überwiegende Anteil besteht allerdings aus IgG und C3. Diese Befunde lassen eine Differenzierung zwischen VP und BP nicht zu (36, 52, 57, 58, 69, 128). In der IIF in SS-Technik findet sich bei dem BP ein durchgehend epidermales Muster, bei dem VP ein inhomogenes Muster mit einem epidermalen, aber teilweise auch dermalen Muster (60). Ursächlich hierfür ist z.B. die Anti-Laminin-5 Variante des VP. Hierbei finden sich Autoantikörper gegen Laminin-5, das in der Lamina densa inseriert. Die Bindungsseite liegt

somit unterhalb der Trennungsebene der SS-Technik und wird nun dermal dargestellt (60). Auch noch nicht charakterisierte Antigene unterhalb der Trennungsebene könnten dafür verantwortlich sein.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir in 60% der Biopsien eine positive Fluoreszenz mit Anti-IgG in der DIF nachweisen. Diese Werte liegen etwas unterhalb der Ergebnisse in der Literatur. Ursächlich hierfür kann die inhomogene Patientenzusammensetzung des Kollektives sein. Bei Patienten mit einem enoralem Befall finden wir eine positive DIF in 83%, bei konjunktivalem VP nur von 55%.

Unterteilt man die Fälle des okulären VP in rein okuläre VP (POCP) und in Fälle mit multilokulären Schleimhautbefall inklusive der Konjunktiva (OCP), zeigen sich interessante Unterschiede in den IF-Untersuchungen. So finden sich in unseren Fällen mit OCP in 55% eine positive DIF, bei dem POCP aber nur in 20%. Die Ergebnisse der IIF sind gleichartig. Diese Tatsache konnte auch in bereits publizierten Untersuchungen gezeigt werden (116, 117). Es stellt sich somit die Frage, ob es sich hierbei um einen indirekten Hinweis auf unterschiedliche Erkrankungen oder Subtypen des VP handelt. Hierfür existieren weitere Hinweise. Neben den Unterschieden im Nachweis zirkulierender Antikörper und positiver DIF (116, 117) finden sich auch Hinweise über eine signifikant erhöhte Frequenz des HLA-DQB1\*0301 Allels bei Patienten mit POCP (23).

Erstmals konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass sich bei unseren Ergebnissen nicht nur deutliche Unterschiede in der Sensitivität der DIF zeigen, wenn nach Lokalisation des Schleimhautbefalles differenziert wird, sondern auch, wenn wir nach Schweregrad des Schleimhautbefalles stratifizieren. So zeigt sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der betroffenen Regionen und der positiven DIF. Bei Patienten mit dem Befall nur einer SH-Region findet sich die höchste Rate an positiven DIF-Ergebnissen. Diese Korrelation ist in bisher publizierten Studien nicht untersucht worden. Auch dies

könnte ein indirekter Hinweis auf unterschiedliche pathophysiologische Entitäten im heterogenen Bild des VP sein.

Die indirekte Immunfluoreszenz zeigt im Rahmen anderer Untersuchungen eine hohe Streubreite zwischen 12% und 88 % positiver Ergebnisse in Fällen des VP (Tabelle x). In den von uns untersuchten Fällen konnten wir in 40% zirkulierende Antikörper vom IgG-Typ nachweisen. Die Anwendung von Spalthauttechnik erbrachte keine höhere Rate an positiven Ergebnissen.

In einem Fall (Patient Nr. 7) konnte nur durch die Anwendung der IIF die exakte Diagnose bei negativer DIF gestellt werden. In allen anderen Fällen ergab die IIF gegenüber die DIF keine zusätzlichen Informationen.

Diese Ergebnisse legen es nahe, die DIF und die IIF als Routinediagnostik im Rahmen des VP beide beizubehalten. Auch wenn die Sensitivität der Methoden nicht sehr hoch ist, ist sie im Einzelfall zur exakten Diagnosestellung erforderlich.

Zusammenfassend können wir folgende Aussagen zur Immunfluoreszenzdiagnostik des CP treffen:

- Die Sensitivität der DIF korreliert negativ mit dem Ausmaß des Schleimhautbefalles (Anzahl betroffener Regionen).
- Im Rahmen des rein okulären VP liegt die Sensitivität der DIF deutlich niedriger als im multilokulären VP mit Augenbeteiligung. Dies kann ein Hinweis auf die Existenz eines Subtyps des rein okulären VP sein. Ansonsten finden wir keine Hinweise auf Lokalisationsabhängigkeit.
- Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IF und der histologischen Varianten des VP feststellen.
- Die IIF erbringt keine Erhöhung der Diagnosesicherheit im Rahmen des VP.

## **6.5 Die Wertigkeit der Blasentypisierung anhand der Typ-IV-Kollagen-Darstellung im Rahmen des VP**

Die Abgrenzung des VP zum BP stellt unter Zuhilfenahme der Klinik, der Histologie, der DIF und IIF zumeist keine große Schwierigkeit dar. Im Gegensatz hierzu stellt sich die Abgrenzung zur Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) und die Differenzierung von Subtypen des VP, z. B. dem Anti-Laminin-5 VP, gelegentlich schwierig dar (7). Im Rahmen der EBA werden Autoantikörper gegen das Kollagen VII der Ankerfibrillen gebildet und deren Interaktion mit der Zielstruktur resultiert letztlich in einer Spaltbildung unterhalb der Lamina densa (129). Die Bindung der Antikörper bei dem Laminin 5-VP kann zumeist nicht mehr von einer dermalen Bindung differenziert werden, da das Laminin 5 im Bereich der Lamina densa inseriert. Konsekutiv fände sich keine epidermale Fluoreszenz, wie es für das VP typische wäre (60). Alle anderen subepidermalen blasenbildenden Autoimmunerkrankungen gehen mit einem Kohärenzverlust oberhalb der Lamina densa einher. Die exakte Zuordnung der Bindungsregion der Autoantikörper zum exakten Substrat ist mittels der DIF, IIF auch in Verbindung mit der Spalthauttechnik nicht immer möglich (7). Exakte morphologische Aussagen bedürfen der Immunelektronenmikroskopie. Diese Technik ist für die Routinediagnostik zu aufwändig und nicht immer durchführbar.

Genau hier würde die Anwendung des Kollagen IV in der Routinehistologie der blasenbildenden Autoimmunerkrankungen eine elegante und unaufwendige Methode zur Optimierung der exakten Lokalisation des Kohärenzverlustes darstellen.

Kollagen IV ist eine zentrale Komponente der BMZ und in der Lamina densa lokalisiert (130). Mutationen in den Genen, die für das Kollagen IV codieren, resultieren in Defekten der BMZ der Nieren und der Haut. Das klinische Korrelat ist das Alport-Syndrom mit Defekten der BMZ der renalen Gefäße und konsekutiver Glomerulonephritis (131). Ganz aktuell konnte eine neue Variante

der blasenbildenden Autoimmunerkrankungen mit IgA-AK-Bildung gegen Bestandteile des Kollagen IV beschrieben werden, die mit einer progredienten Glomerulonephritis einhergeht (132).

Die Blasentypisierung anhand der Kollagen IV Darstellung ist bisher überwiegend in der Diagnostik von hereditären blasenbildenden Erkrankungen zur Anwendung gekommen und konnte hier den Goldstandard der Elektronenmikroskopie in der exakten Diagnostik nicht verdrängen (133-135).

Eine Anwendung im Rahmen der Diagnostik von blasenbildenden Autoimmunerkrankungen ist bisher nur sporadisch erfolgt. In einer Untersuchung anhand von Biopsien von BP, VP und EBA korrelierten die Ergebnisse gut mit denen der IF an der SST und dem Immunoblotting. Trotzdem wurde die Methode als ungeeignet für die Routinediagnostik angesehen (136). In aktuellen Studien wird die Blasentypisierung mittels Kollagen IV Darstellung im Rahmen der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie neben dem Mapping der Autoantigene angewendet. Hierbei dient die Blasentypisierung mittels der Kollagen IV Darstellung der exakten Lokalisation der Lamina densa. Mit dieser Methode ist, analog der Immunelektronenmikroskopie, eine exakte Lokalisierung der in vivo gebundenen Immunglobuline und somit eine Diagnosestellung möglich (137, 138).

Wie wir zeigen konnten, ist im Rahmen der Routinehistologie ohne Anwendung der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie bei allen durchgeführten Kollagen IV-Färbungen zweifelsfrei eine exakte Lokalisation der Lamina densa in Bezug zur Spaltbildung darstellbar. Bei allen Patienten mit VP zeigte sich eine Anfärbung des Blasenbodens. Somit lässt sich eine exakte Differenzierung zur EBA gewährleisten.

Wie in dem Falle des Patienten Nr.25 gezeigt, lässt sich erst unter Zuhilfenahme der Kollagen IV Färbung eine Abgrenzung der Anti-Laminin 5 Fälle zur EBA ermöglichen.

Zusammenfassend können wir folgende Aussage über die Kollagen IV Darstellung in der Diagnostik des VP treffen:

Die Kollagen IV Darstellung ermöglicht die Differenzierung zwischen VP, BP und EBA in der Routinehistologie subepidermaler blasenbildender Autoimmunerkrankungen.

## 7. Zusammenfassung

Zusammenfassend können wir folgende Aussage über die lokalisationsabhängigen Merkmale der Histologie des VP treffen:

- Gemeinsame Merkmale -unabhängig von der Lokalisation- sind: vakuolige Degeneration, Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen im Infiltrat und Nachweis von Fibrose.
- Charakteristika für die Histologie der KSH sind das fast komplette Fehlen von Eosinophilen im Infiltrat, eine stärker ausgebildete Fibrose und der deutlich geringere Nachweis einer subepidermalen Spaltbildung. Ein lichenoides Infiltrat lässt sich nicht nachweisen.
- In der GSH lässt sich immer eine subepidermale Spaltbildung und ein lichenoides Infiltrat nachweisen.
- Die Histologie der MSH ist charakterisiert durch das deutliche Überwiegen eines eosinophilen Infiltrates in Verbindung mit leichter Fibrose.

Die postulierte, histologische Variante des VP ist nachweisbar. Über diese Variante können wir folgende Aussagen treffen:

- Sie findet sich nie bei okulärem VP
- Sie findet sich wahrscheinlich durchgängig bei genitalem VP
- Sie findet sich bei monolokulärem als auch bei multilokulären Befall des VP
- Es besteht keine Korrelation zu Schweregrad, Zeitpunkt und Verlauf des VP

Die Immunfluoreszenzdiagnostik des VP erlaubt folgende Aussagen:

- Die Sensitivität der DIF korreliert negativ mit dem Ausmaß des Schleimhautbefalles (Anzahl betroffener Regionen).
- Im Rahmen des rein okulären VP liegt die Sensitivität der DIF deutlich niedriger als im multilokulären VP mit Augenbeteiligung. Dies kann ein Hinweis auf die Existenz eines Subtyps des rein okulären VP sein. Ansonsten finden wir keine Hinweise auf Lokalisationsabhängigkeit.
- Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IF und den histologischen Varianten des VP feststellen.
- Die IIF erbringt keine Erhöhung der Diagnosesicherheit im Rahmen des VP.

Die Blasentypisierung mittels Kollagen IV Darstellung an Biopsien des VP läßt folgende Aussage zu::

- Die Blasentypisierung anhand der Kollagen IV Darstellung ermöglicht die Differenzierung zwischen VP und EBA in der Routinehistologie subepidermaler blasenbildender Autoimmunerkrankungen unter Verzicht auf Immunelektronenmikroskopie.

## 8. Literatur

1. McKee P. : Pathology of the skin, 2<sup>nd</sup> edition, pp 1.4-1.8, Mosby-Wolfe, London, 1996
2. Chan L. : Human skin basement membrane in health and autoimmundiseases, *Frontiers in bioscience* (2), pp 343-353, 1997
3. Georgi M, Jainta S, Bröcker E, Zilikens D.: Autoantigene subepidermal blasenbildender Autoimmundermatosen, *Hautarzt* (52), pp 1079-1089, 2001
4. Pleyer U, Bruckner-Tudermann L, Friedmann A, Hartmann C, Simon J, Sterry w.: The immunology of bullous oculo-muco-cutaneous disorders, *Immunol today* (17), pp 111-113, 1996
5. Hertl, Schuler G: Bullöse Autoimmundermatosen, *Hautarzt* (53), pp 207-221, 2002
6. Megahed M: Histopathology of blistering diseases. With clinical, electron microscopic, immunological and molecular biological correlations, Springer Verlag, Heidelberg, 2004
7. Fleming T, Kormann N: Cicatricial pemphigoid, *J Am Acad Dermatol* (43), pp 571-591, 2000
8. Ahmed R, Kurgis B, Rogers R: Cicatricial pemphigoid, *J Am Acad Dermatol* (24), pp 987-1001, 1991
9. Chan L et al.: The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: Definition, diagnsotic criteris, pathogenetic factors, medical treatment and prognostic factors, *Arch Dermatol* (138), pp 370-379, 2002
10. Wichmann JE: Ideen zur Diagnostik, Helwing, Hannover, pp 89-92, 1794
11. Cooper W: Pemphigus of the conjunctiva, *Ophthal Hosp Rep*, pp 155-157, 1885
12. Graefe A et al: Kasuistik aus der Augenheilkunde zu Halle, *Graefes Arch*, pp 157, 1879
13. Thost A: Der chronische Schleimhaut-Pemphigus der oberen Luftwege, *Arch Laryng Rhinol*, pp 459-478, 1911
14. Civatte A: Le diagnostic des dermatoses bulleuses an laboratorie, *Arch Belg Dermatol Syphiligr* (5), pp 273-5. 1949
15. Lever WF: Pemphigus: A histopathologic study, *Arch Dermatol Syphilol* (64), pp 727-53. 1951
16. Lever, WF: Pemphigus, *Medicine* (32), pp 1-123, 1953
17. Mutasim DF, Pelc N, Anhalt GJ: Cicatricial pemphigoid, *Dermatol Clin* (11), pp 499-510, 1993
18. Zilikens D, Wever S, Roth A, Hashimoto T, Broker E: Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central germany, *Arch Dermatol* (131), pp 957-958, 1995
19. Chan LS: Mucous membrane pemphigoid, *Clinics in dermatology* (19), pp 703-711, 2001

20. Cheng Y, Rees TD, Wright JM, Plemons JM: Childhood oral pemphigoid: a case report and review of the literature, *J Oral Pathol Med* 30(6), pp 372-7, 2001
21. Zaltas MM, Ahmed r, Foster CS: Association of HLA-DR4 with ocular cicatricial pemphigoid, *Curr eye res* (8), pp 189-93, 1989
22. Nayar M, Wojnarowska F, Venning V, Taylor CJ: Association of autoimmunity and cicatricial pemphigoid: Is there an immunogenetic basis?, *J Am Acad Dermatol* (25), pp 1011-5, 1991
23. Chan L, Wang T, Hammerberg C, Cooper KD: High frequency of HLA-DQB1\*0301 allele in patients with pure ocular cicatricial pemphigoid, *Dermatol* (189 suppl 1), pp 99-101 , 1994
24. Chan L, Hammerberg c, Cooper KD: Significantly increased occurrence of HLA-DQB1\*0301 allele in patients with ocular pemphigoid, *J Invest Dermatol* (108), pp 129-32, 1997
25. Gallagher G, Shklar G: Oral involvement in mucous membrane pemphigoid, *Clin Dermatol* (5), pp 18-27, 1987
26. Hanson RD, Olsen KD, Rogers RS: Upper aerodigestive tract manifestations of cicatricial pemphigoid, *Ann Otol Rhinol Laryngol* (97), pp 493-9, 1988
27. Ahmed AR, Hombal SH: Cicatricial pemphigoid. *Int J Dermatol* (25), pp 90-6., 1986
28. Rosenbaum MM, Esterly NB, Greenwald MJ., et al. : Cicatricial pemphigoid in a 6 year old, report of a case and review of the literature, *Ped Dermatol* (2), pp 13-22, 1984
29. Hardy KM, Perry HO, Pingree GC, Kirby TJ: Benign mucous membrane pemphigoid, *Arch Dermatol* (106), pp 467-75, 1971
30. Pleyer U, Müller B: Okuläres vernarbendes Pemphigoid, *Hautarzt* (98), pp 584-599, 2001
31. Mondino BJ, Linstone FA: Ocular pemphigoid, *Clin Dermatol* (5), pp 28-35, 1987
32. Tauber J, Jabbur N, Foster CS: Improved detection of disease progression in ocular cicatricial pemphigoid, *Cornea* (5), pp 446-51, 1992
33. Pouliquen Y, Patey A, Foster CS et al: Drug induced cicatricial pemphigoid affecting the conjunctiva. Light and electron microscopy features, *Ophthalmology* (93), pp 775-738, 1986
34. Messmer EM, Hintschich CR, Partsch K, Messer G, Kampik A: Okuläres vernarbendes Pemphigoid, *Ophthalmologie* (97), pp 113-120, 2000
35. Hardy KM, Perry HO: Benign mucous membrane pemphigoid, *Arch Dermatol* (104), pp 467-475, 1971
36. Brunsting LA, Perry HO: Benign pemphigoid. A report of seven cases with chronic scarring, herpetiformis plaques about the Head and neck, *Arch Dermatol* (75), pp 489-501, 1957
37. Leenutaphong V, von Kries R, Plewig G: Localized cicatricial pemphigoid (Brunsting Perry): Electron microscopic study, *J Am Acad Dermatol* (21), pp 1089-93, 1989
38. Setterfield J et al: Paraneoplastic cicatricial pemphigoid, *BJD* (141), pp 127-131, 1999

39. Taiuchi K, Takata M, Matsui C et al: Antiepiligrin cicatricial pemphigoid associated with an underlying gastric carcinoma producing laminin 5, *BJD* (140), pp 696-700. 1999
40. Lish KM, Washenik K, Yancey KB et al: Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid in a patient with HIV, *J Am Acad Dermatol* (36), pp 486-8, 1997
41. Lenz P, Hsu R, et al: Vernarbendes Pemphigoid mit Autoantikörpern gegen Laminin 5 bei einer Patientin mit metastasierenden Endometriumkarzinom, *Hautarzt* (49), pp31-35, 1998
42. Curth HO: Skin lesions and internal carcinoma, In: *Cancer of the skin*, Philadelphia, Saunders, pp 1308-43, 1976
43. Winkelmann RK, Su WPD: Pemphigoid vegetans, *Arch Dermatol* (115), pp 446-448, 1979
44. Wolff K, Rappersberger K, Steiner A, Konrad K: Vegetating cicatricial pemphigoid, *Arch Dermatol res* (279), pp 30-37, 1987
45. Lever WF: *Pemphigus and pemphigoid*, Springfield: Charles C. Thomas, 1965
46. Foster CS: Ocular pemphigoid, *Trans Am Ophthalmol* (55), pp 527-663, 1986
47. Shklar G, McCarthy PL: Oral lesions of mucous membrane pemphigoid, *Arch Otolaryngol* (93), pp 354-64. 1971
48. Person JR, Rogers RS: Bullous and cicatricial pemphigoid: clinical, histopathological and immunopathological correlations, *Majo Clin Proc* (52), pp 54-66, 1977
49. Egan CA, Yancey KB: The clinical and immunopathological manifestations of anti-epiligrin cicatricial pemphigoid, a recently defined subepithelial autoimmune blistering disease, *Eur J Dermatol* (10), pp 585-9, 2000
50. Griffith MR, Fukujama K, Tuffanelli D, Silverman S: Immunofluorescence studies in mucous membrane pemphigoid, *Arch Dermatol* (109), pp 195-9, 1974
51. Rogers RS, Perry HO, Bean SF, Jordan RE: Immunopathology of cicatricial pemphigoid: studies of complement deposition, *J Invest Dermatol* (68), pp 39-43, 1977
52. Fine JD, Neises GR, Katz SI: Immunofluorescence and immunoelectron microscopic studies in cicatricial pemphigoid, *J Invest Dermatol* (82), pp 39-43, 1984
53. Laskaris G, Angelopoulos A: Cicatricial pemphigoid: direct and indirect immunofluorescence studies, *Oral surgery* (51), pp 48-51, 1981
54. Barnadas MA, Gelpi C, Curell R et al: Repeat direct immunofluorescence (DIF) test, using 1M NaCl treated skin, in the subepidermal autoimmune bullous disease that contain IgG at the dermal epidermal junction, *J Cut Pathol* (26), pp 37-41, 1999
55. Dantzig P: Circulating Antibodies in CP, *Arch Dermatol* (108), pp 264-6, 1973
56. Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P, Claudy A: Diagnostic value of indirect immunofluorescence on Sodium Chlorid-split skin in differential diagnosis of subepidermal autoimmune bullous dermatoses, *Arch Dermatol* (133), pp 1102-1107, 1997

57. Murakami H, Nishioka S et al: Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA autoantibodies in 50 patients with cicatricial pemphigoid, *J Dermatol Science* (17), pp 39-44, 1998
58. Kelly SE, Wojnarowska F: The use of chemically split tissue in the detection of circulating anit basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid, *BJD* (118), pp 31-40, 1988
59. Gammon WR, Fine JD, Forbes M, Briggaman RA: Immunofluorescence on split skin for the detection and differentiation of basement membrane zone autoantibodies, *J Am Acad Dermatol* (27), pp 79-87, 1992
60. Domloge-Hultsch N, Anhalt GJ, Gammon WR, et al: Antiepiligrin cicatricial pemphigoid: a subepithelial bullous disorder, *Arch Dermatol* (130), pp 1521-9, 1994
61. Susi Fr, Shklar G: Histochemistry and fine structure of oral lesions of mucous membrane pemphigoid, *Arch Dermatol* (104), pp 244-253, 1971
62. Caputo R, Bellone AG, Crosti C: Pathogenesis of the blister in cicatricial pemphigoid and in bullous pemphigoid, *Arch Dermatol Forsch* (247), pp 181-192, 1973
63. Shimizu H, Masunaga T et al: Autoantibodies from patients with cicatricial pemphigoid target differnt sites in epidermal basement, *J Invest Dermatol* (104), pp 370-3, 1995
64. Murphy GF: Histology of th skin, in: *Lever's histopathology of the skin 8<sup>th</sup> edt*, Lipincott-Raven, pp 17-19, 1977
65. Kirtschig G: Autoantigene des vernarbenden Pemphigoids und ihre pathogenetische Bedeutung, *Hautarzt* (49), pp 818-825, 1998
66. Zilikens D: Aquired skin diseases of hemidesmosomes, *J Dermatol Science* (20), pp 134-155, 1999
67. Sakai LY, Keene DR, et al: Typ VII collagen is the major structural component of anchoring fibrils, *J cell Biol* (103), pp 1577-1586, 1986
68. Hertl M, Schuler G: Bullöse Autoimmundermatose, Teil 2: Pathogenese, (53), pp 277-85, 2002
69. Setterfield J, Shirlaw PJ, Bhogal BS et al: Cicatricial pemphigoid: Serial titres of circulating IgG and IgA antibasement membrane Antibodies correlate with disease activity, *BJD* (140), pp 645-650, 1999
70. Dabelsteen E: Molecular biological aspects of aquired bullous diseases, *Crit Rev Oral Biol Med* (9), pp 162-78, 1998
71. Bedane C; McMillan JR; Balding SD et al: Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally seperately epitopes on the BP180 ectodomain, *J Invest Dermatol* (108), pp 901-7, 1997
72. Masunaga T Shimizu H, Yee et al: The extracellular domain of BPAg2 localizes to anchoring filaments and ist carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human basement membrane, *J Invest Dermatol* (109), pp 200-6, 1997
73. Chan LS, Majmudar AA, Tran HH et al: Laminin 6 and Laminin 5 are recognized by autoantbodies in a subste of cicitricial pemphigoid, *J Invest Dermatol* (108), pp 848-53, 1997

74. Horiguchi Y, Ueda M, Shimizu H, Tanaka T et al: An aquired bullous dermatosis due to an autoimmun reaction against uncein, BJD ( 134), pp 934-38, 1996
75. Ghohestani RF, Nicolas JF, Rousselle P et al: Identification of a 168 kD mucosal antigen in a subset of patient with cicatricial pemphigoid, J Invest Dermatol 107, pp 136-9, 1996
76. Bernauer W, Itin PH, Kirtschig G: Cicatricial pemphigoid, vol 28 in: Bernauer, Datr, Elder (eds) Cicacitrising conjunktivitis, Karger, Basel, pp 46-63, 1997
77. Anhalt GJ, Labib RS, Vorhees JJ et al: Induktion of pemphigus in enonatal mice by passive transfer of IgG from patients with disease, N Eng J Med (306), pp 1189-92, 1982
78. Lazarova Z, Yee C, Darling T, Briggaman RA, Yancey KB: Passive transfer of anti laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice, J Clin Invest (98), pp 1509-18, 1996
79. Liu Z, Diaz LA, Troy LJ et al: A passive transfer model of the organ specific autoimmundisease bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen BP180, J Clin Invest (92), pp 2480-88, 1993
80. Bernard Ph, Prost C , Durepaire N, Basset-Seguin N: The major cicatricial pemphigoid antigen is a 180 kD protein that shows immunologic cross-reactivity with the bullous pemphigoid antigen J Invest Dermatol 99 pp174-179 1992
81. Balding SD, Prost C, Diaz LA, Bernard P, Bedane C et al: Cicatricial pemphigoid antibodies react with multiple sites on the BP 180 extracellular domain, J Invest Dermatol (106), pp 141-6, 1996
82. Nakatani C, Muramatsu T., Shirai T. : Immunreactivity of bullous pemphigoid autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen : immunoblot analysis und enzym-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins, Brit J Dermatol, pp 365-70, 1998
83. Marinkovich MP, Lunstrum GP et al: The dermo-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant, J Cell Biol(119), pp 695-703, 1992
84. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R et al: A new nomeklature for the laminins, Matrix Biol (14), pp 209-11, 1994
85. Rousselle P, Lunstrum GP et al: Kalinin. An epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments, J Cell Biol, pp 567-576, 1991
86. Bhol K, Dans MJ, Simmons RK et al: The autoantibodies to  $\alpha 6\beta 4$  Integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmatic domain of  $\beta 4$ , J Immunol (165), pp 2824-29, 2000
87. Bhol K, Goss L, Kumari S, Ahmed AR: Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid, J Dent Res (80), pp 1711-5, 2001
88. Borradori L, Sonnenberg A: Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion molecules, J invest Dermatol (112), pp 411, 1999
89. Chan RY, Bhol K et al: The role of antibody to human  $\beta 4$  integrin in conjunktival basement membrane seperation: possible in vitro model for ocular cicatricial pemphigoid, J Invest Opthamol Vis Sci, pp 2283-90, 1999

90. Smith EP, Zone JJ, Egan CA et al: The 45 kD ocular cicatricial pemphigoid antigen is a keratin, *J Invest Dermatol* (110), pp 509, 1998
91. Zeng L, Daniels A, Ridelle K, Fine JD: Uncein, an anchoring filament component, is similar to kalinine but differs markedly in its in vitro expression by normal human keratinocyte monolayers, *J Invest Dermatol* (102), pp 535b, 1994
92. Bhol K, Tyasi SR et al: Characterisation of oral pemphigoid antigen, *J Invest Dermatol* (108), pp 636, 1997
93. Wakaugawa M, Nakamura K, Hino H et al: Elevated levels of eotaxin and IL-5 in blister fluid of bullous pemphigoid: correlation with tissue eosinophilia, *BJD* (143), pp 112-6, 2000
94. Engineer L, Bhol K, Kumari S, Ahmed A: Bullous pemphigoid: interaction of IL5, anti-basement membrane zone antibodies and eosinophils. A preliminary observation, *Cytokien* (13), pp 32-38, 2001
95. Heiligenhaus A, Schaller J et al: Eosinophilic granule proteins expressed in ocular cicatricial pemphigoid, *Br J Ophthalmol* (82), 312-7, 1998
96. Smith EA: Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma, *Curr Opin Rheumatol* (4), pp 869-77, 1992
97. Noguchi H, Kephart GM et al: Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis, *Am J Pathol* (140), pp 521-528, 1992
98. Elder MJ, Dart JK, Lightman S: Conjunctival fibrosis in ocular cicatricial pemphigoid: the role of cytokines, *Exp Eye Res* (65), pp 165-76, 1997
99. Razzaque MS, Ahmed AR: Collagens, collagen binding heat shock protein 47 and transforming growth factor beta1 are induced in cicatricial pemphigoid: possible role in dermal fibrosis, *Cytokine* (17), pp 311-6, 2002
100. Hoang-Xuan T, Foster CS et al: Mast cells in conjunctiva affected by cicatricial pemphigoid, *Ophthalmology* (96), pp 1110-4, 1989
101. Letko E, Bhol K, Colon J et al: Biology of IL-5 in ocular cicatricial pemphigoid, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (240), pp 565-9, 2002
102. Razzaque MS, Ahmed BS, Foster CS, Ahmed AR: Effects of IL-4 on conjunctival fibroblasts: possible role in ocular cicatricial pemphigoid, *Invest Ophthalmol Vis Sci* (44), pp 3417-23, 2003
103. Razzaque MS, Foster CS, Ahmed AR: Role of enhanced expression of m-CSF in conjunctiva by cicatricial pemphigoid, *Invest Ophthalmol Vis Sci* (43), pp 2977-83, 2002
104. Kailash C, Bohl K et al: Presence of IL-10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid, *Cytokine* (12), pp 1046-1083, 2000
105. Hertl M, Schuler G: Bullöse Autoimmundermatosen: Diagnostik und therapie, *Hautarzt* (53), pp 352-366, 2002
106. Messmer EM, Hintschich CR, Partsch K et al: Okuläres vernarbendes Pemphigoid: Retrospektive Analyse von Risikofaktoren und Komplikationen, *Hautarzt* (97), pp 113-120, 2000

107. Kormann NJ: New and emerging therapies in the treatment of blistering diseases, *Dermatol Clinics* (18), pp 127-137, 2000
108. Axt M, Wever S et al: Das vernarbende Pemphigoid- ein therapeutisches Problem, *Hautarzt* (46), pp 620, 1995
109. Megahed M, Schmiedeberg S, Becker J, Ruzicka T: Treatment of cicatricial pemphigoid with mycophenolate mofetil as a steroid-sparing agent, *J Am Acad Dermatol* (45), pp 256-9, 2001
110. Dutt J, Ledoux D et al: Collagen Abnormalities in conjunktiva of patients with cicatricial pemphigoid, *Cornea* (15), pp 606-11, 1996
111. Jordan RE, Kwana S, Fritz KA: Immunopathologic mechanisms in pemphigus and bullous pemphigoid, *J Invest Dermatol* (1985), pp 72-78, 1985
112. Schaller J, Niedecken HW, Biwer et al: Charakterisierung lymphozytärer Infiltratzellen bei bullösen Pemphigoid und Pemphigus vulgaris, *Dermatol Monatschr* (176), pp661-668,1990
113. Bousquet J, Chanez P et al: Eosinophilic inflammation in asthma, *N Eng J Med* (19910), pp 1033-1039, 1990
114. Caproni M, Calzolari A et al: Cytokine profile and supposed contribution to scarring in cicatricial pemphigoid, *J Oral Pathol Med* (32), pp 34-40, 2003
115. Bernauer W, Wright P, Dart JK et al: Cytokines in the conjunktiva of acute an chronic mucous membrane pemphigoid: an immunohistochemical analysis, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (231), pp 563-70, 1993
116. Hoang-Xuan T, Robin H, Demers PE et al: Pure ocular pemphigoid. A distinct immunopathologic subset of cicatricial pemphigoid, *Ophthalmology* (106), pp 355-61, 1999
117. Chan LS, Yancey KB, Hammerberg C et al: Immune-mediated subepithelial blistering diseases of the mucous membrane. Pure ocular cicatricial pemphigoid is a unique clinical and immunopathological entity distinct fromm bullous pemphigoid and other subsets identified by antigenic specificity of autoantibodies, *Arch Dermatol* (129), pp 448-55, 1993
118. Marren P, Walkden V et al: Vulval cicatricial pemphigoid my mimic lichen sclerosus, *BJD* (134), pp 522-4, 1996
119. Lalani T, Bhol K, Khan IU, Ahmed AR: The scarring processes in mucosal tissue after immun injury, *Semin Arthritis Rheum* (27), pp 371-81, 1998
120. Rogers RS, Sheridan PJ, Nightingale SH: Desquamative gingivitis: clinical, histopathologic, immunopathologic and therapeutic observation, *J Am Acad Dermatol* (7), pp 729-35
121. Dayan S, Simmons RK, Ahmed R: Contemporary issues in the diagnosis of oral Pemphigoid, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (88), pp 424-30, 1999
122. Razzaque MS, Foster CS, Ahmed AR: Tissue and molecular events in human conjunctival scarring after cicatricial pemphigoid, *Histol Histopathol* (16), pp 1203-12, 2001

123. Roat MI, Sossi G, Lo CY, Thoft RA: Hyperproliferation of conjunctival fibroblasts from patients with cicatricial pemphigoid, *Arch Ophthalmol* (107), pp 1064-7, 1989
124. Davis AL, Bhogal BS et al: Lichen planus pemphigoides: It's relationship to bullous pemphigoid, *BJD* (125), pp 263-71, 1991
125. Bouloc A, Vignon-Pennmen MD et al: Lichen planus pemphigoides is a heterogeneous disease: a report of five cases studied by immunoelectron microscopy, *BJD* (138), pp 972-80, 1998
126. Hsu S, Ghohestani RF, Uitto J: Lichen planus pemphigoides with IgG autoantibodies to the 180 kD bullous pemphigoid antigen, *J Am Acad Dermatol* (42), pp 136-41, 2000
127. Zillikens D, Caux F, Mascaro JM et al: Autoantibodies in lichen planus pemphigoides react with a novel epitope within the c-terminal NC16a domain of BP180, *J Invest Dermatol* (113), pp 117-21, 1999
128. Demers PE, Robin H, Prost C et al: immunopathologic testing in patients suspected of ocular cicatricial pemphigoid, *Curr Eye Res* (17), pp 823-7, 1998
129. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ et al: Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa aquisita, *N Eng J Med* (310), pp 1007-1013, 1984
130. Kuhn K: Basement membrane (type IV) collagen, *Matrix Biol* (14), pp 439-445, 1994
131. Sado Y, Kagawa M et al: Organisation and expression of basement membrane collagen IV genes and their roles in human disorders, *J Biochem* (123), pp 767-76, 1998
132. Ghostani RF, Rotunda SL, Hudson B et al: Crescentic glomerulonephritis and subepidermal blisters with autoantibodies to alpha5 and alpha6 chains of type IV collagen, *Lab Invest*(83), pp 605-11, 2003
133. Bolte C, Gonzales S: Rapid diagnosis of major variants of congenital epidermolysis bullosa using a monoclonal antibody against collagen type IV, *Am J Dermatopathol* (17), pp 580-3, 1995
134. Hintner H, Stingl G, Schuler G et al: Immunofluorescence mapping of antigenic determinants within the dermal-epidermal junction in the mechanobullous diseases, *J Invest Dermatol* (76), pp 113-8, 1981
135. Petronius D, Bergmann R et al: A comparative study of immunohistochemistry and electron microscopy used in the diagnosis of epidermolysis bullosa, *Am J Dermatopathol* (25), pp 198-203, 2003
136. Bowszyc-Dmochowska M, Hashimoto T et al: Evaluation of an avidin-boitin-peroxidase method with a monoclonal antibody to type IV collagen in the differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa aquisita, *J Dermatol* (24), pp 217-22, 1997
137. Wozniak K, Kazama T, Kowalewski C: A practical technique for differentiation of subepidermal bullous disease: localisation of in vivo bound IgG by laser scanning confocal microscopy, *Arch Dermatol* (139), pp 1007-11, 2003
138. Kazama T, Yamamoto Y et al: Application of confocal laser scanning microscopy to differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa aquisita, *BJD* (138), pp 593-601, 1998

## 9. Lebenslauf

<b>Name</b>	Anke Margarete Hofmann, geb. Henneke
<b>Geburtsdatum, -Ort</b>	24.11.1965, Dortmund
<b>Familienstand</b>	verheiratet mit Dr. med. Benedikt Hofmann
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Konfession</b>	römisch-katholisch
<b>Anschrift</b>	Am Südpark 19 41466 Neuss
<b>Kinder</b>	Felicitas Maria, geb. 25.1.1991 Lovis Flora, geb. 2.6.1997
<hr/>	
<b>Schulbildung</b>	Widely-Grundschule, Dortmund 1972-1976  Stadt-Gymnasium, Dortmund 1976-1985
<b>Studium</b>	Studium der Biologie, Universität Würzburg 1985-1986  Studium der Humanmedizin, Universität Erlangen 1986-1987  Studium der Humanmedizin, Universität Köln 1987-1993
<hr/>	
<b>Beruflicher Werdegang</b>	AIP an der Universitäts-Hautklinik, Köln Prof. Dr. med. Krieg 1993-1994  Approbation 1.1.1995  Assistenärztin an der Universitäts-Hautklinik, Köln Prof. Dr. med. Krieg 1995-1997  Fachärztin für Haut- und Geschlechtskrankheiten 1997  Niederlassung als Fachärztin für Haut- und Geschlechtskrankheiten in Leverkusen, 1999

## Zusammenfassung

### **Das vernarbende Pemphigoid: Klinik, Histologie, Immunfluoreszenzbefunde und Blasentypisierung mittels Kollagen IV-Darstellung.**

**Anke Hofmann**

Das vernarbende Pemphigoid (VP) ist eine seltene, klinisch und pathogenetisch heterogene Gruppe von subepidermal bullösen Autoimmunerkrankungen, deren gemeinsames Merkmal der Kohärenzverlust zwischen Epidermis und Dermis im Bereich der Haut und Schleimhäute darstellt. Es sind eine Reihe von verschiedenen Zielantigenen definiert. Anhand von 25 Patienten mit VP werden erstmalig *lokalisationsabhängig* die klinischen, histologischen und immunhistochemischen Unterschiede sowie die Wertigkeit der Typ-IV-Kollagen Darstellung untersucht.

Gemeinsame histologische Merkmale des VP, unabhängig von der Lokalisation, sind neben der dermo-epidermalen Spaltbildung, die vakuolige Degeneration der Basalzellschicht und der Nachweis der Fibrose. Charakteristika für die Histologie der konjunktivalen Schleimhaut sind das fast komplette Fehlen von Eosinophilen im Infiltrat, eine stärker ausgebildete Fibroseneigung und der deutlich seltenere Nachweis einer subepidermalen Spaltbildung. In der Genitalschleimhaut lässt sich immer eine subepidermale Spaltbildung und ein lichenoides Infiltrat nachweisen. Die Histologie der oralen Läsionen ist charakterisiert durch das deutliche Überwiegen eines eosinophilen Infiltrates in Verbindung mit einer geringer ausgeprägten Fibrosierung.

Neben dem klassischen histologischen Bild konnte eine *lichenoide Variante* des VP nachgewiesen werden. Hierbei ähnelt des Infiltratmuster dem eines Lichen ruber mucosus mit bandförmigen subepidermalen Infiltrat. Diese Variante findet sich nie bei dem okulärem VP, dagegen in allen histologischen Präparaten des genitalen VP. Eine Korrelation zu Schweregrad, Zeitpunkt und Verlauf des VP findet sich nicht.

Die Sensitivität der direkten Immunfluoreszenz (DIF) im Rahmen des VP korreliert negativ mit dem Ausmaß des Schleimhautbefalles gemessen an der Anzahl der betroffener Regionen. Im Rahmen des rein okulären VP liegt die Sensitivität der DIF deutlich niedriger als bei dem multilokulären VP mit Augenbeteiligung. Dies kann als Hinweis auf die Existenz eines Subtyps des rein okulären VP gewertet werden. Daneben finden sich keine weiteren Hinweise auf eine Lokalisationsabhängigkeit. Eine Korrelation zwischen histologischer Variante des VP und der DIF existiert nicht.

In der Differentialdiagnostik des VP in Abgrenzung zu anderen subepidermalen, bullösen Autoimmundermatosen stellt die Kollagen IV-Darstellung in der Routinehistologie eine sinnvolle Erweiterung dar. Es konnte in allen Fällen ein exaktes Mapping des Kollagen IV in Bezug auf die Spaltbildung erfolgen. Anhand dieses immunhistochemischen Mappings kann auf die Immunelektronenmikroskopie in der Differentialdiagnose zwischen VP und Epidermolysis bullosa aquisisa (EBA) verzichtet werden.

Diese klinischen, histologischen und immunfluoreszenzdiagnostischen Befunde unterstreichen die aufgrund molekularbiologischer Erkenntnisse vermutete Heterogenität der Entität des VP. Neben den unterschiedlichen Zielantigenen des VP ist der Ablauf des entzündlichen Geschehens im Krankheitsverlauf wahrscheinlich bestimmend für die klinische und somit auch histologische Ausprägung des VP.

Prof. Dr. med. M. Megahed