



Iuliu Hațieganu University of  
Medicine and Pharmacy  
Cluj-Napoca

Habilitation thesis

Risk factors and clinico-immunological profile  
of patients with  
pemphigus and pemphigoid

Summary

Adrian Baican

Cluj-Napoca 2018

## Summary

The habilitation thesis entitled "Risk factors and clinico-immunological profile of patients with pemphigus and pemphigoid" represents a synthetic overview of my scientific, professional and academic activity carried out after Ph.D defense in order to prove my qualification to obtain the Certificate of Habilitation.

The main clinical research directions in which I have had important contributions are: the incidence and prevalence of autoimmune bullous diseases in Romania, the possible risk factors for overall mortality in a characterized group of patients with pemphigus and bullous pemphigoid, the risk of developing steroid induced diabetes in pemphigus vulgaris patients, the clinico-immunological features of trauma-induced bullous pemphigoid and the development of an ELISA for the diagnosis of anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid.

We analyzed for the first time the epidemiological data on autoimmune blistering diseases in the Northwestern region of Romania and we provide the estimates of the incidence and prevalence of pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. Interestingly, the pemphigus and not pemphigoid diseases were the most frequent autoimmune diseases. A particular genetic susceptibility or a shorter life expectancy of the Romanian population may contribute to this finding. Our observation confirm that clinical phenotype correlates with the anti-desmoglein autoantibody profile. However, a significant part of the pemphigus vulgaris did not have the phenotype predicted by their autoantibody profile.

This analysis was followed by a retrospective hospital-based cohort study on risk factors for overall mortality in a characterized group of patients with pemphigus vulgaris and foliaceus. The collected epidemiological, clinical and imunopathological variables were the age of onset, gender, ethnicity, alcohol consumption, subtype of disease, subtype of pemphigus vulgaris,

associated comorbidities at diagnosis, value of erythrocyte sedimentation rate at diagnosis, initial dose of corticosteroids, follow-up time, direct immunofluorescence microscopy findings, titres of anti-desmoglein 1 and anti-desmoglein 3 autoantibodies. In pemphigus vulgaris group, univariate analysis found a statistically significant association between the age of onset  $\geq 65$  years, presence of coronary heart disease, presence of cardiac arrhythmia, level of anti-desmoglein1 autoantibodies  $\geq 100$  U/mL at diagnosis and the survival of the patients. In patients with pemphigus foliaceus, age of onset  $\geq 65$  years was associated with poor survival. The newly identified factors have major implications for the stratification of patients and design of personalized therapeutic plans in the clinical setting.

The main component in the treatment of pemphigus vulgaris are systemic corticosteroids, which are associated with a number of side effects including steroid induced diabetes. In our study, 31 out of 137 patients with pemphigus vulgaris (22.62%) developed steroid induced diabetes after corticosteroid treatment. We evaluated the steroid induced diabetes patients in terms of age, body mass index, cumulative cortisone dose, treatment duration and anti-desmogleins 1, 3 and anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies, as possible clinical and immunological risk factors of developing diabetes in pemphigus patients. Anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies were positive in 20.75% of patients with pemphigus vulgaris and in 25.75% of patients with pemphigus vulgaris and steroid induced diabetes. In our study, the new-onset hyperglycemia persisted even after the treatment with glucocorticoids was stopped. Persistent hyperglycemia could be explained by the status of immunosuppression. A screening test for anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies could be used in patients aged younger than 45 years at diagnosis of diabetes to indicate those who have an increased risk of requiring insulin therapy.

In the next study, we aimed to contribute to a better understanding of the pathogenetic mechanisms involved in the onset of bullous pemphigoid induced by different trigger factors. In addition to our retrospective analysis, a comprehensive review of the 59 published cases was conducted, regarding the involvement of trigger factors in bullous pemphigoid, and clinical, epidemiological and immunological data were collected. In our study, conducted on nine patients diagnosed with bullous pemphigoid, various trigger factors were identified: contrast substance injection, surgical procedure, mechanical trauma, insect bite, thermal burn, radiotherapy and ultraviolet exposure associated with pre-existing psoriasis. One likely hypothesis advocates the theory that bullous pemphigoid patients already have low titers of anti-basement membrane autoantibodies, which, themselves, are not pathogenic and do not induce the disease, by simply binding to the antigen. The physical factors cause tissue destruction, triggering a cascade of pro-inflammatory stimuli. Tissue destruction is followed by wound remodeling, which means a new inflammatory process. Vascular endothelial growth factor, one of the released cytokines during tissue injury and reparation, increases vascular permeability, with a subsequent increased storage of circulating autoantibodies and recruitment of inflammatory cells, particularly granulocytes. The autoantibodies will bind to granulocytes, activate the complement and initiate of a loop of inflammatory stimuli. Activated granulocytes release proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinase-9, resulting in degradation of the extracellular domain of BP180 and formation of the bullae. Our findings in indirect immunofluorescence, complement binding test and cryosection assay sustain this theory.

Another research topic was the development of a new immunoassay, as a quick, affordable, largely accessible and non-invasive screening method for anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. This subtype of mucous membrane pemphigoid has a chronic course and

an increased risk of malignancy. We have developed an ELISA for diagnosis of this disease, using as antigenic substrate recombinant laminin 332. We demonstrated that recombinant laminin 332 has comparable antigenic properties to native laminin 332, when taken as a substrate for development of an ELISA. Our study will enhance the knowledge and understanding of the pathogenesis of anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid, the importance of the molecules in maintaining homeostasis of the basement membranes and their role in autoimmunity and malignancy.

I published 48 scientific papers, out of which 10 were published as first author or corresponding author in ISI indexed journals with cumulative impact factor 26,279. My Hirsch index is 6, with 388 citations. I was the director of a national research grant, member of the research team in two national research projects and mentor in two internal grants.

The future scientific development plans aim to continue the research in the fields of autoimmune bullous pathogenesis such as: the pathogenic role of complement activation in bullous pemphigoid and the development of more specific diagnostic and monitoring tools.

Regarding to my didactic activity I will continue to teach my students evidence based medicine in correlation with a problem-based learning curriculum, in order to develop their critical thinking, creativity, curiosity, acquisition of skills and most importantly, their open-mindedness.



Universitatea de Medicină și  
Farmacie Iuliu Hațieganu  
Cluj-Napoca

Teza de abilitare

Factori de risc și profilul clinico-imunologic la  
pacienții cu pemfigus și pemfigoid

Rezumat

Adrian Baican

Cluj-Napoca 2018

## Rezumat

Teza de abilitare cu titlul "Factori de risc și profilul clinico-imunologic la pacienții cu pemfigus și pemfigoid" reprezintă o sinteză a activității științifice, profesionale și academice realizată după susținerea tezei de doctorat în scopul de a demonstra calificarea pentru obținerea Certificatului de Abilitare.

Principalele direcții de cercetare în care am avut contribuții importante sunt: incidența și prevalența bolilor buloase autoimune în România, factorii de risc posibili pentru mortalitatea generală la un grup caracterizat de pacienți cu pemfigus și pemfigoid bulos, riscul de a dezvolta diabet postcortizonic la pacienții cu pemfigus vulgar, caracteristicile clinico-imunologice ale pemfigoidului bulos indus de traume și dezvoltarea unei metode ELISA pentru diagnosticul pemfigoidului cicatricial anti-laminină 332.

Am analizat pentru prima dată caracteristicile epidemiologice ale bolilor buloase autoimune în regiunea de nord-vest a României și am estimat incidența și prevalența pemfigusului vulgar și a pemfigoidului bulos. Interesant, pemfigusul și nu pemfigoidul a fost cea mai frecventă boală buloasă autoimună. O susceptibilitate genetică particulară sau speranța de viață mai redusă a populației din România pot contribui la aceste rezultate. Observațiile noastre au confirmat că fenotipul clinic se corelează cu profilul autoanticorpilor anti-desmogleină. Totuși, o parte semnificativă a pacienților cu pemfigus vulgar nu au avut fenotipul indicat de profilul de autoanticorpi.

Această analiză a fost urmată de un studiu retrospectiv, tip cohortă, a factorilor de risc pentru mortalitatea generală la un grup de pacienți cu pemfigus vulgar și foliaceu. Variabilele epidemiologice, clinice și imunopatologice înregistrate au fost: vârsta de debut, sex, etnia, consumul de alcool, subtipul de boală, subtipul de pemfigus vulgar, comorbiditățile asociate la

diagnostic, valoarea vitezei de sedimentare a hematiilor la diagnostic, doza inițială de cortizon, perioada de urmărire, caracteristicile imunofluorescenței directe și titrul autoanticorpilor anti-desmogleină 1 și 3. În grupul cu pemfigus vulgar, analiza univariată a evidențiat, cu semnificație statistică, asocierea dintre vârsta de debut  $\geq 65$  de ani, prezența bolii coronariene, prezența aritmiei cardiace, nivelul autoanticorpilor anti-desmogleină 1  $\geq 100$  U/ml la diagnostic, și supraviețuirea pacienților. La pacienții cu pemfigus foliaceu, vârsta de debut  $\geq 65$  de ani a fost asociată cu o supraviețuire redusă. Factorii noi identificați au implicații majore pentru stratificarea pacienților și realizarea de strategii terapeutice personalizate în practică.

Terapia de bază a pemfigusului vulgar, reprezentată de corticosteroizii sistemici, este asociată cu numeroase efecte secundare, printre care și diabetul postcortizonic. În studiul nostru, din 137 de pacienți cu pemfigus vulgar, 31 (22,6%) au dezvoltat diabet postcortizonic. La pacienții cu diabet postcortizonic am evaluat următorii parametri: vârstă, index de masă corporală, doza cumulată de cortizon, durata tratamentului, și nivelele autoanticorpilor antidesmogleină 1, 3 și anti-decarboxilaza acidului glutamic, ca posibili factori de risc clinici și imunologici pentru apariția diabetului postcortizonic. Autoanticorpii anti-decarboxilaza acidului glutamic au fost pozitivi la 20,75% din pacienții cu pemfigus vulgar și la 25,75% din pacienții cu pemfigus vulgar asociat cu diabet postcortizonic. În studiul nostru, hiperglicemia cu debut recent a persistat și după ce tratamentul cu glucocorticoizi a fost stopat. Hiperglicemia persistentă ar putea fi explicată prin statusul de imunosupresie. Un test screening pentru autoanticorpi anti-decarboxilaza acidului glutamic ar putea fi utilizat pentru pacienții cu vârsta sub 45 de ani la diagnosticul de diabet pentru a-i selecta pe cei cu risc crescut de tratament cu insulină.

În studiul următor, am avut ca obiectiv să contribuim la înțelegerea mecanismelor patogenetice implicate în declanșarea pemfigoidului bulos indus de factori trigger diverși. În



plus, am realizat o evaluare extinsă a celor 59 de cazuri publicate cu factori trigger implicați în pemfigoidul bulos și am analizat datele epidemiologice și imunopatologice. La cei nouă pacienți din studiul nostru, diagnosticați cu pemfigoid bulos am identificat o serie de factori trigger: injectarea de substanță de contrast, procedură chirurgicală, traumă mecanică, înțepătură de insectă, arsură termică, radioterapie și expunere la ultraviolete asociată cu psoriazis preexistent. O ipoteză posibilă susține teoria că pacienții cu pemfigoid bulos au deja nivele scăzute de autoanticorpi anti-membrană bazală, care nu sunt patogeni și nu pot induce boala prin simpla legare de antigen. Factorii fizici determină distrucții tisulare prin declanșarea unei cascade de stimuli pro-inflamatori. Distrucția tisulară este urmată de remodelarea injuriei, ceea ce înseamnă un nou proces inflamator. Factorul vascular de creștere endotelială, o citokină eliberată în timpul injuriei și reparației tisulare, crește permeabilitatea vasculară, cu o stocare crescută de autoanticorpi circulanți și o recrutare de celule inflamatorii, în particular granulocite. Autoanticorpii se vor lega de granulocite, cu activarea complementului și inițierea cascadei de stimuli inflamatori. Granulocitele activate eliberează enzime proteolitice, cum ar fi matrix metalopeptidaza-9 rezultând degradarea domeniului extracelular al BP180 și formarea de bule. Rezultatele noastre de la imunofluorescența indirectă, testul de fixare a complementului și studiul pe criosecțiuni susțin această teorie.

O altă direcție de cercetare a fost dezvoltarea unei metode imunologice de screening rapidă, cu accesibilitate largă, ieftină pentru diagnosticul pemfigoidului cicatricial anti-laminină 332. Acest subtip de pemfigoid cicatricial are o evoluție cronică și un risc crescut de malignitate. Am dezvoltat o metodă ELISA pentru diagnosticul acestei boli utilizând ca substrat antigenic laminina 332 recombinată. Am demonstrat că laminina 332 recombinată are proprietăți antigenice comparabile cu laminina 332 nativă, când sunt utilizate ca substrat pentru dezvoltarea

tehnicii ELISA. Studiul nostru va contribui la cunoașterea și înțelegerea patogenezei pemfigoidului cicatricial anti-laminină 332, importanței moleculelor în menținerea homeostaziei membranei bazale și rolului lor în autoimunitate și malignitate,

Am publicat 48 de articole științifice, din care 10 au fost publicate ca prim autor sau autor corespondent în jurnale indexate ISI, totalizând un factor de impact cumulativ de 26,279.

Indicele Hirsch este 6, cu 388 de citări. Am fost directorul unui grant național de cercetare, membru în echipele de cercetare din două granturi naționale și mentor la două granturi interne.

Planurile viitoare de dezvoltare științifică sunt de continuare a cercetărilor în domeniul patogenezei bolilor buloase autoimune, cum ar fi rolul activării complementului în pemfigoidul bulos și dezvoltarea unor metode mai specifice de diagnostic și monitorizare.

În ceea ce privește activitatea didactică, voi continua să-i învăț pe studenți medicina bazată pe dovezi în corelație cu dezvoltarea curriculei de învățare prin probleme, și dezvoltarea gândirii critice, creativității, curiozității, achiziționarea de abilități și cel mai important receptivitatea față de noutăți.