



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**PEMFİGUS VULGARİS HASTALIĞINDA
FOLİKÜLER YARDIMCI T HÜCRELERİNİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erkan ERGÜN

Antalya, 2016



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**PEMFİGUS VULGARİS HASTALIĞINDA
FOLİKÜLER YARDIMCI T HÜCRELERİNİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erkan ERGÜN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe AKMAN KARAKAŞ

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No: 2014.04.0103.014)**

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2016

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Ayşe AKMAN KARAKAŞ'a, tezimde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Erkan ALPSOY ve Prof. Dr. Soner UZUN'a ve asistanlığım boyunca deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Özlem DİCLE, Prof. Dr. Ertan YILMAZ ve Prof. Dr. Ülker GÜL'e teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar işlemlerinde ve yazımında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Aslı TOYLU ve Uzm. Biyolog Nurten SAYIN EKİNCİ'ye teşekkür ederim.

Tezimin hasta toplama ve hasta verilerinin elde edilmesi aşamasında emeği geçen asistan arkadaşlarıma ve istatistiksel değerlendirmede yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Dr. Selen Bozkurt'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vi
Çizelgeler Dizini	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Sınıflandırma	3
2.2 Epidemiyoloji	5
2.3 Etyoloji	5
2.4 Patogenez	9
2.5 Klinik	20
2.5.1 Pemfigus Vulgaris	21
2.5.2 Pemfigus Vejetans	22
2.5.3 Pemfigus Foliasus	23
2.5.4 Fogo Selvagem (Brezilya PF, Endemik Pemfigus)	23
2.5.5 Pemfigus Eritematozus	23
2.5.6 Paraneoplastik Pemfigus	24
2.5.7 IgA Pemfigusu	25
2.5.8 Pemfigus Herpetiformis	26
2.5.9 İlaç ilişkili Pemfigus	26
2.6 Tanı	27
2.6.1 Sitoloji	27
2.6.2 Histopatoloji	28
2.6.3 İmmünfloresan Yöntemler	29
2.6.4 ELISA	31
2.6.5 İmmünoblotting ve İmmünopresipitasyon	32
2.6.6 Elektron ve İmmünoelektron Mikroskopisi	32

2.6.7 İİF Mozaik Tabanlı Biyoçip	33
2.7 Ayırıcı Tanı	33
2.8 Tedavi	34
2.8.1 İlk Basamak Tedavi	35
2.8.2 İmmünsüpresif Adjuvanlar	36
2.8.3 Ek Destek Tedavi	43
2.9 Klinik İzlem	44
2.10 Prognoz	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımlanması	47
3.2 ELISA Yöntemi	51
3.3 Akım (Flow) Sitometri Yöntemi	52
3.3.1 Yüzey Antijen Boyaması	52
3.3.2 Hücre İçi Boyama	53
3.4 PCR	54
3.5 İstatiksel Yöntem	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR	71
7. ÖZET	72
8. ABSTRACT	73
9. KAYNAKLAR	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AZT:	Azatiyoprin
BCL6:	B-cell lymphoma 6
BMZ:	Bazal membran zonu
C3:	Kompleman 3
CXCR5:	C-X-C kemokin reseptör tip 5
Dsc:	Desmokollin
Dsg:	Desmoglein
DİF:	Direkt immünofloresan
ELISA:	Enzim linked immunosorbent assay
HLA:	Human lökosit antijenleri
ICOS:	İndüklenebilir T hücre kostimülatör
İEN:	İntraepidermal nötrofilik
İg:	İmmünglobulin
İİF:	İndirekt immünofloresan
İVİG:	İntravenöz immünglobulin
İSA:	İntersellüler aralık
KS:	Kortikosteroid
MMF:	Mikofenolat mofetil
PD1:	Programlı hücre ölümü 1
PE:	Pemfigus eritematozus
PF:	Pemfigus foliaceus
PH:	Pemfigus herpetiformis
PNP:	Paraneoplastik pemfigus
PV:	Pemfigus vulgaris
PVeg:	Pemfigus vegetans
SAP:	SLAM-ilişkili protein
SPD:	Subkorneal püstüler dermatoz
PDAI:	Pemphigus disease area index
Tfh:	Foliküler yardımcı T
TPMT:	Tiyopürin metiltransferaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Desmozomal adezyon molekülleri (Otoantijenler)	12
2.2.	Pemfigusta antikor nedenli hücre apoptozisi	13
2.3.	Desmoglein kompensasyon teorisi	15
2.4.	Pemfigusta T ve B hücrelerinin rolü	16
2.5	Tfh hücreleri ve germinal merkezdeki moleküler mekanizmalar	20
2.6.	Pemfigus vulgaris tedavisinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı'nda kullanılan tedavi algoritması	43
3.1.	Akım sitometri yöntemi ile Tfh hücrelerinin belirlenmesi	53
3.2.	Akım sitometri yöntemi ile hücre içi IL-6 ve IL-21'in belirlenmesi	54
4.1.	Plazma IL-21 düzeylerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımı	58
4.2.	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ Tfh hücrelerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımı	59
4.3.	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ Tfh hücrelerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımı	60
4.4.	Kontrol ve hasta gruplarının CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ lenfositlerde hücre içi IL-21 bulundurma oranları	61
4.5.	Kontrol ve hasta gruplarında BCL6 geni mRNA ifade seviyelerinin dağılımı	62
4.6.	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ Tfh hücrelerinin hasta grubu içinde tedavi alımlarına göre ve kontrol grubunda dağılımı	64
4.7.	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ PD1 ⁺ Tfh hücrelerinin hasta grubu içinde tedavi alımlarına göre ve kontrol grubunda dağılımı	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
2.1.	Pemfigus sınıflaması 1	3
2.2.	Pemfigus sınıflaması 2	4
2.3.	Kimyasal yapılarına göre pemfigusa neden olan ya da pemfigusu tetikleyen ilaçlar	7
2.4.	Camisa ve Helm tarafından PNP tanısı için önerilen tanı kriterleri	25
2.5.	Pemfigus için hastalık aktivite durumu ve tedavi yanıtlarına ait tanımlamalar	45
3.1.	PDAI (Pemphigus Disease Area Index)	48
4.1.	Hasta ve kontrol grubunun demografik ve klinik bilgileri	56
4.2.	PV hastalarının karakteristikleri	57
4.3.	Pemfigus hastalarının ve kontrol grubunun laboratuvar bulguları	63

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pemfigus nadir görülen kronik seyirli otoimmün büllöz bir hastalıktır. Pemfigus formları içinde en sık görülen pemfigus vulgaris'tir (PV) (1). Hücreler arası adezyon yapılarına karşı gelişen otoantikorlar sonucu keratinositlerin birbirlerinden ayrılması olan akantoliz, tüm pemfigus formlarında saptanan en temel olaydır. Hücreler arası maddenin çözülmesini izleyen desmozomlardaki ayrışma sonucu intraepidermal bül gelişir. PV'de antikorlar ağırlıklı olarak desmoglein 3 (Dsg3) ve daha az olarak desmoglein 1 (Dsg1)'e karşı gelişir (2,3).

Pemfigusta otoreaktif T hücreleri patojenik otoantikorların üretiminde B hücrelerine yardımcı olurlar. Hastalardan elde edilen periferik T hücrelerinin çoğunluğunun CD4⁺ hafıza fenotipi, az bir kısmının da CD8 reseptör taşıdığı belirlenmiştir (4). Güncel çalışmalar, CD4⁺ T hücrelerinin temel bir işlevinin özellikle germinal merkez yapılarında B hücrelerinin çoğalmasını ve antikor üretimini düzenleyen hücreler olduğunu göstermiştir (5). Yine son yapılan çalışmalarda foliküler yardımcı T (Tfh) hücrelerinin, yeni bir CD4⁺ T alt kümesi olduğu ve germinal merkezde (6) antijene özgü B hücrelerinin gelişiminde görev aldığı gösterilmiştir (7). Çeşitli çalışmalar Tfh hücrelerinin, B hücrelerinden antikor üretimine neden olarak romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıklarda rol oynayabileceğini göstermiştir (8,9). PV hastalarında çeşitli immunoglobulin tiplerinin saptanması ve IL-6'nın serum ve lezyonlarda bulunması bu hastalık tipinde Tfh hücrelerinin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Şu ana kadar literatürde PV patogenezinde Tfh hücrelerinin potansiyel rolü ve periferik kandaki düzeyleri hakkında sadece bir çalışma yapılmış olup bu konu hakkında ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (10).

Bu çalışmada, PV hastalarının kan dolaşımındaki Tfh hücrelerinin fenotipinin, plazma IL-21 sitokin seviyesinin ve dolaşımdaki hücrelerin "B-cell lymphoma 6" (BCL6) gen ifadesi seviyesinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olması öngörülmektedir. Çalışmanın amacı, Tfh hücrelerinin PV patogenezindeki rolü hakkında fikir sahibi olmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Pemfigus kelimesi yunancada baloncuk, kabarcık anlamındaki “pemphix” kelimesinden gelmektedir (11). İki yüzyıldır bilinen bir hastalık olup orjinal ismi 1791’de Winchman tarafından verilmiştir. Pemfigus terimi ciltteki büllöz erüpsiyonların çoğunu kapsamaktadır ancak tanısız testlerin gelişmesinden sonra büllöz hastalıklar yeniden sınıflandırılmıştır. Bugün için yaşamı tehdit etme potansiyeline sahip, histolojik olarak akantoliz, klinik olarak deri ve müköz membranların erozyon ve büllöz lezyonlarıyla ayırt edilen otoimmün hastalıklar için kullanılmaktadır.

Klinik olarak pemfigus epidermisteki lezyonların yerleşim yerine göre çeşitli formlara ayrılmaktadır. Yüzeysel pemfigus formlarında yani, pemfigus foliaceus (PF), fogo selvagem (Brezilya pemfigusu) ve pemfigus eritematozusta (PE) büller; stratum korneumun altında ve epidermiste yüzeysel yerleşimlidir; derin pemfigus formlarında yani pemfigus vulgaris (PV) ve pemfigus vejetansta (PVeg) büller; bazal hücre tabakasının üstünde, epidermisin derin tabakalarında yerleşimlidir (12). Diğer pemfigus grubu hastalıklar içerisinde genellikle lenfositik neoplazilerle ilişkili olan paraneoplastik pemfigus (PNP) (13) ve genellikle penisilamin veya kaptopril kullanımından sonra görülen ilaç ilişkili pemfigus yer almaktadır (14).

Keratinositlerin hücre duvarında yer alan desmosomal kadherinlere karşı gelişen otoimmün süreç bu moleküllerin adeziv fonksiyonlarını bozar. Bunun sonucunda keratinositler ayrılır ve büller oluşur. Anatomik, serolojik ve moleküler analizde çeşitli pemfigus formlarında antikorların farklı yapıları hedef aldığı görülmüştür. Farklı pemfigus formlarında epidermisin farklı seviyelerinde lezyon görülmesinin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak farklı epidermis tabakalarındaki farklı hedef antijenlerin bulunması ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (15,16).

Pemfigus nadir görülmesine rağmen bazen büyük çapta hasara neden olabilmektedir. Tedavi edilmediğinde deride, orofaringeal bölgede ülserler ve enfeksiyon sonucunda ölümcül olabilmektedir (17). Önemli olan erken tanı ve tedavi ile hastalık aktivitesinde erken ve tedavisiz tam remisyon elde etmektir.

2.1 Sınıflandırma

Klasik sınıflandırmada pemfigus, epidermisteki ayrışmanın yerine göre derin (suprabazal) ayrışmaya neden olan PV ve yüzeysel (subkorneal veya üst epidermal) ayrışmaya neden olan PF olarak başlıca iki temel tipe ayrılmıştır (1,15). Daha sonra klinik ve histopatolojik özelliklerin yanı sıra immüno Floresan inceleme ile saptanan otoantikor tipi ve etyolojide sorumlu tutulan ilaç, hastalıklar ve epidemiyolojik özellikleri içeren sınıflama kullanılmaya başlanmıştır. Buna göre 5 ana başlığa ayrılan sınıflama Çizelge 2.1’de verilmiştir (18).

Çizelge 2.1. Pemfigus sınıflaması 1 (18)

• Pemfigus vulgaris
Pemfigus vejetans
• Pemfigus foliaceus
Pemfigus eritematozus
Fogo selvagem: Endemik tip
• Paraneoplastik pemfigus
• İlaça bağlı pemfigus
• IgA pemfigusu

Son yıllarda ise klinik ve histopatolojik özelliklerin yanısıra immüno Floresan inceleme ile saptanan otoantikor tipi, immünblot ve “Enzim linked immunosorbent assay” (ELISA) gibi moleküler yöntemlerle saptanan hedef antijenleri de içeren bir sınıflandırma gündemdedir (15,19). Bu sınıflandırma Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Bu sınıflamada PV sadece desmoglein 3’ ü (Dsg3) hedef alan ve mukozal ağırlıklı tutulumla giden ve desmoglein 3 ile desmoglein 1’ in (Dsg1) her ikisini de hedef alarak mukoza ve deri tutulumu ile giden 2 alt tipe ayrılmıştır.

Çizelge 2.2. Pemfigus sınıflaması 2 (18)

Tip	İg	Antijen
Pemfigus vulgaris		
Mukoza ağırlıklı	İgG	Dsg 3
Mukoza ve deri tutulumlu	İgG	Dsg 3+ Dsg 1
Pemfigus vejetans	İgG	Dsg 3+ Dsg 1
Pemfigus foliaceus	İgG	Dsg 1
Pemfigus eritematozus	İgG	Dsg 1
Pemfigus herpetiformis	İgG	Dsg 1, Dsg 3
İlacı bağı pemfigus	İgG	Heterojen
Dönüşüm gösteren	İgG	Dsg 1 ve/veya Dsg 3
Paraneoplastik pemfigus	İgG	Plektin, desmoplakin, BP230, envoplakin, periplakin, p170, Dsg3, Dsg1, Dsc
IgA pemfigusu		
Subkorneal püstüler dermatoz tipi	İgA	Dsc
İntraepidermal nötrofilik tipi	İgA	Kesinleştirilememiş
IgA pemfigus vulgaris	İgA	Dsg3
IgA pemfigus foliaceus	İgA	Dsg1
IgG/IgA pemfigus	İgG/ İgA	Dsc1-3
Endemik		
Brezilyalılarda	İgG	Dsg 1, Dsg 3, Dsc 1-3
Tunuslularda	İgG	Dsg 1, Dsg 3
Kolombiyalılarda	İgG	Dsg 1

İg: İmmünoglobulin, Dsg: Desmoglein, Dsc: Desmokollin

2.2 Epidemiyoloji

Dünya çapında pemfigus vakalarına bakıldığında, yılda 0.5-16.1/milyon hastayı etkilemektedir (20). Hastalık tüm ırkları etkileyebilmektedir ancak Askenazi Yahudiler’inde, Akdeniz ırkında sık görüldüğü bildirilmiştir (21). Kuzey Amerika’dan Simon ve ark. nın çalışmasında hastalığın sıklığı Yahudi kökenlilerde 32/milyon, diğer etnik kökene sahip olanlarda ise 4,2/milyon olarak bildirilmiştir (22).

Pemfigus formları içinde en sık görülen PV’dir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada da pemfigus hastalarının %83,1’i PV tanısı almıştır (23). Hastalığın insidansı Avrupa’nın güneyinde kuzeyine göre daha yüksektir. Yunanistan, İtalya, Romanya, Bulgaristan, Makedonya ve Sırbistan’da yapılan çalışmalarda hastalığın insidansı 4-8/milyon arasında değişmektedir (20). Kliniğimizin de içerisinde yer aldığı çok merkezli bir çalışmada, Uzun ve ark. hastalığın Akdeniz bölgesindeki yıllık insidansını 2,4/milyon olarak saptamış ve en sık görülen büllöz hastalık olarak bildirmiştir (23).

Hastalık primer olarak orta yaştakileri etkilemekte olup ortalama görülme yaşı yaklaşık 40-60’dır (2). Adölesanlarda ve hatta çocukluklarda ve yaşlılarda da görülebilir. Erkek-kadın oranı yaklaşık eşittir, fakat pubertede kızlar erkeklerden daha çok etkilenmektedir (17).

PF’nin sporadik formları dünyadaki tüm etnik grupları etkilemektedir; fakat endemik formu (fogo selvagem) Brezilya’nın kırsal ve tropik bölgelerinde sık görülmektedir, bu bölgelerde PF vakalarının PV vakalarına oranı 20:1’dir. Bu ülkede yaklaşık 15.000 kişinin PF’den etkilendiği bildirilmiştir (24). Peru, Kolombiya, Cezayir ve Tunus PF’nin sık bildirildiği diğer ülkelerdir. Pemfigusun bu formu genç yaşlarda (ergenlik dönemi ve 20 yaş civarı) daha sık görülmektedir (25).

2.3 Etyoloji

Pemfigus hastalığının etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte; otoimmün bir hastalık olan pemfigusun genetik yatkınlık zemininde endojen

ve/veya eksojen faktörlerin rol oynamasıyla tetiklenerek ortaya çıktığı öngörülmektedir.

a) Genetik

Çoklu ailesel vakalar veya aileden çocuğa kalıtım nadirdir (26). Fakat çeşitli insan lökosit antijeni (HLA) allellerinin pemfigus epidemiyolojisinde rolü vardır. Pemfigus ve HLA doku antijenleri ile ilgili olarak ilk defa Krain ve ark. Yahudilerde özellikle HLA-A*10 birlikteliğine işaret etmişlerdir (27). Pemfigus ile ilgili literatürde HLA sınıf II antijenlerinden HLA-DRB1*04, DRB1*14 ve DQB1*05 antijenleriyle güçlü birliktelik bildirilmiştir. HLA-DRB1*04 antijeni özellikle Askenazi kökenli Yahudi hastalarda, HLA-DRB1*14 antijeni ise Avrupalı beyaz ırk, Amerikalı beyaz ırk, Japon, Meksikalı, Hintli ve Pakistanlı hastalarda daha sık görülmektedir (28).

Kliniğimizde yapılan kontrollü bir çalışmada ise PCR-SSP yöntemi ile HLA tiplendirmesi yapılmış, pemfigus hastalarında HLA-A*11, CW*01, HLA-DRB1*04, DRB1*14, DQB1*05 ve DPB1*0401 antijenlerinin sıklıkları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Pemfigusta yaygın olarak saptanan HLA sınıf II antijenlerinin yanı sıra toplumumuzda bazı HLA sınıf I antijenlerinin de pemfigusta sık gözlendiğini gösterilmiştir (29).

b) İlaçlar

Pemfigusa neden olan ilaçların başında tiyol grubu ilaçlar gelmektedir. Bunlar içerisinde başta penisilamin ve kaptopril olmak üzere, penisilin deriveleri, piroksikam, altın sodyum tiyomalat, tiyamazol bulunmaktadır (2,30).

Başka bir sorumlu ilaç grubu ise fenol grubu içeren ilaçlardır. Bunlar içerisinde ise aspirin, rifampin, levodopa, eroin, pentaklorofenol ve fenobarbitaller bulunmaktadır.

Sefalosporin grubu ilaçların bazıları tiyol grubu, bazıları ise fenol grubu içerisinde yer alır.

Diğer ilaçlar arasında ise kaptopril dışındaki ACE inhibitörleri, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar, nifedipin ve immun cevabı biyolojik olarak modifiye eden

sitokin, interferon ve aşılar yer alır (30). Pemfigusu tetikleyen ilaçların özeti Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kimyasal yapılarına göre pemfigusa neden olan ya da pemfigusu tetikleyen ilaçlar (30)

Tiyol grubu (sülfidril radikali içeren ya da salan ilaçlar)

- Penisilamin
- Kaptopril
- Penisilin ve deriveleri
- Sefalosporinler *
- Altın sodyum tiyomolat
- Tiyomazol

Fenol grubu (fenol halkası taşıyan ilaçlar)

- Sefalosporinler *
- Rifampin
- Levodopa
- Eroin
- Pentaklorofenol
- Fenobarbital

Tiyol ve Fenol içermeyen ilaçlar

- Kaptopril hariç ACE inhibitörleri
- NSAID ilaçların çoğu
- Nifedipin
- İmmün yanıtı modifiye edici biyolojik ajanlar (aşılar, interferonlar ve diğer sitokinler)
- Diğerleri

ACE (angiotensin-converting enzyme), NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drug)

* Bazı sefalosporinler hem tiyol hem fenol içerir.

c) Neoplaziler

PV ve PF'de timoma, PVeg'te akciğer, kolon, mide kanseri, IgA pemfigusunda B hücreli lenfoma ve akciğer kanseri, pemfigus herpetiformiste (PH) akciğer ve prostat kanseri ile birliktelik gösteren olgular bildirilmiştir (31). PNP'de ise eşlik eden neoplazilerin %84'ünü hematolojik maligniteler oluşturmaktadır. Bunların içerisinde non-hodgkin lenfoma (%38,6), kronik lenfositik lösemi (%18,4), Castelman Hastalığı (%18,4), timoma (%5,5), Waldenstrom makroglobulinemisi (%1,2), Hodgkin lenfoma (%0,6) ve monoklonal gammopati (%0,6) bulunmaktadır. Hematolojik kökenli olmayan %16'lık kısmı ise epitelyal karsinomlar (pankreas, kolon, meme vb.) (%8,6), mezenkimal kaynaklı sarkomlar (%6,2) ve malign melanom (%0,6) oluşturmaktadır (32).

d)İnfeksiyonlar

Genetik yatkınlığı olan kişilerde herpes virüs infeksiyonlarının pemfigusu tetikleyebileceği ya da mevcut hastalığı alevlendirebileceği düşünülmektedir (30). Bazen de geçirilmekte olan viral infeksiyonlar ve alınan ilaçların kombine etkisi olarak da pemfigus hastalığı görüldüğü öne sürülmektedir. Buna örnek olgulardan biri, koksaki virüs infeksiyonu geçirmekte olan hastada ek bakteriyel komplikasyonları önlemek için verilen sefalosporin (sefiksim) tedavisinden 2 hafta sonra PV gelişen bir hastadır (33). Ayrıca dirençli pemfigus lezyonlarında sekonder infeksiyonlara yönelik tedavi ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir (34,35).

e)Fiziksel ajanlar

UV ve iyonize radyasyon, termal yanıklar ve elektrik yanıkları, cerrahi ve kozmetik girişimlerin pemfigusu tetiklediği bilinmektedir (36-39).

f)Kontakt dermatit

Bazı kimyasal maddeler allerjik kontakt dermatite neden olarak PV'yi tetikleyebilir ya da alevlendirebilir. Bu durum daha çok kuru temizlemede, bahçe işlerinde, endüstriyel solvent işinde ve fotoğrafçılıkla ilgili işlerde kullanılan

kimyasallarda görülmektedir (40). Ayrıca pestisidlere tekrarlayan maruziyet sonucunda gelişen PV olguları da bildirilmiştir (41). Çok merkezli yapılan bir çalışmada pestisidlerin pemfigus gelişim riskini arttırabileceği bildirilmiştir (36).

g)Diyet

Bazı yiyecekler pemfigusun indüksiyonunda, devamında ve alevlenmesinde rol oynayabilmektedir. Bunların başında alyum grubu içeren sebzeler (soğan, sarmısak, pırasa ve mantar) gelmektedir. Bu yiyeceklerin akantolitik potansiyeli in vitro olarak kanıtlanmıştır (42). Yine fenol ve tannik asit içeren (karabiber, kırmızıbiber, çay, kırmızı şarap, kiraz ve böğürtlen) gıdalar da in vitro olarak akantolize yol açabilecek ve şüphelenilen gıdalar arasındadır (43, 44).

h)Emosyonel stres

Deri, sinir sistemi ve immün sistem sitokin ve nörotransmitterler aracılığı ile aynı dili konuşan sistemlerdir (45); bu yüzden şiddetli emosyonel stres, otoimmün bir deri hastalığının başlangıcı veya alevlenmesi ile ilişkili olabilir. Emosyonel strese bağlı olabileceği düşünülen PV vakaları bildirilmiştir (36,46,47).

2.4 Patogeneze

Tüm pemfigus formlarındaki temel patoloji, keratinosit yüzeyine karşı gelişen antikörlerin keratinositler arasındaki adezyonu bozması ile karakterize olan akantolizdir (48). Epidermisteki hücrelerin adezyonundaki en önemli yapının desmozomlar olduğu bilinmektedir. Pemfigus lezyonlarının yapısal çalışmalarında desmozomlardaki çözülmenin bül oluşumuna neden olduğu öne sürülmüştür (49,50).

Aktif hastalığı olan hastaların yaklaşık %80'inde intersellüler antikörler bulunur ve bunlar patojeniktir. Otoantikörlerin patojenitesi için elde edilen kanıtlar şu gözlemlerden elde edilmiştir:

- 1- Titresi genellikle PV aktivitesiyle koreledir (2).
- 2- İnsan derisi kültürlerinde akantolizisi indükleyebilmektedir (51).

3- Neonatal farelere pasif olarak bu antikorlar uygulandığında pemfigus benzeri deri lezyonları ortaya çıkmaktadır (52,53).

4- Aktif hastalığı olan annelerin yeni doğan bebeklerinde geçici olarak otoantikorların plasental transferi nedeniyle pemfigus benzeri lezyonlar görülmektedir (54).

Hastaların yaklaşık %90'ında lezyonda ve lezyona komşu sağlam deride depolanmış intersellüler antikorlar saptanabilir. Bu antikorlar genellikle IgG tipinde olmakla birlikte bazen IgM, IgA ve kompleman proteini C3 depolanması da gözlenebilir (2,55).

Klinik hastalığın dışı vurumu antikor yanıtına bağlıdır. PV ve PF'deki otoantikor üretimi poliklonaldır ve intersellüler antijenlere karşı olan dolaşımdaki çoğu otoantikor IgG4 yapısındadır. Remisyondaki hastalarda ise daha çok IgG1 antikorları bulunur. Yine PV hastalarının HLA class II allellerini taşıyan sağlıklı akrabalarında da serumda düşük titrede IgG1 antikorları bulunabilir (55). Dsg3'e karşı olan IgG1 antikorları PV olan veya olmayan bireylerde eşit sıklıkta bulunur; ancak IgG4 antikorları neredeyse sadece aktif hastalığı olanlarda bulunur. Benzer şekilde Dsg1'e karşı olan IgG1 antikorları da endemik pemfigusun yaygın olduğu Brezilya'da endemik pemfigus olan ya da olmayan ve hastalığı aktif ya da aktif olmayan kişilerde yüksek oranda bulunmaktadır. Fakat aynı antijene karşı olan IgG4 antikorları aktif hastalarda, hastalığı aktif olmayan ya da etkilenmemiş bireylere göre çok daha yüksektir. Endemik pemfigus vakalarında Dsg1'e karşı gelişen patojenik olmayan IgG1 antikor üretiminin bilinmeyen bir çevresel faktör tarafından tetiklenebileceği ve hastalığın kliniğinin de patojenik IgG4 üretimi için gerekli olan HLA yatkınlık genlerinin varlığında ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Pemfigus hastalığının diğer klinik formlarında da benzer şekilde farklı antikor alt tiplerinin rol oynayabileceği düşünülmekle birlikte, IgG1 ve IgG4 antikorlarının farklı patolojik aktivitelerinin hedef antijenlerdeki farklı epitoplara karşı gelişmelerinden mi yoksa efektör fonksiyonlarındaki farklılık nedeniyle mi olduğu henüz bilinmemektedir (2). Akut başlangıçlı ve aktif pemfigus vulgarisli hastalarda IgG4 yanında Dsg3 reaktif IgE otoantikorlarının da bulunduğu ve IgE serum düzeylerinin akut başlangıçla korele olduğu bildirilmiştir (56).

Desmozomlar keratinositler arası bağlantıda temel yapıdır. Desmozomları oluşturan proteinler; desmozomal kaderinler olan desmoglein, desmokollin ve plaklin ailesi üyelerinden; plektin, desmoplakin, envoplakin, periplakindir (Şekil 2.1). Dsg1 ve Dsg3 en iyi tanımlanmış olan pemfigus antijenleridir (57,58).

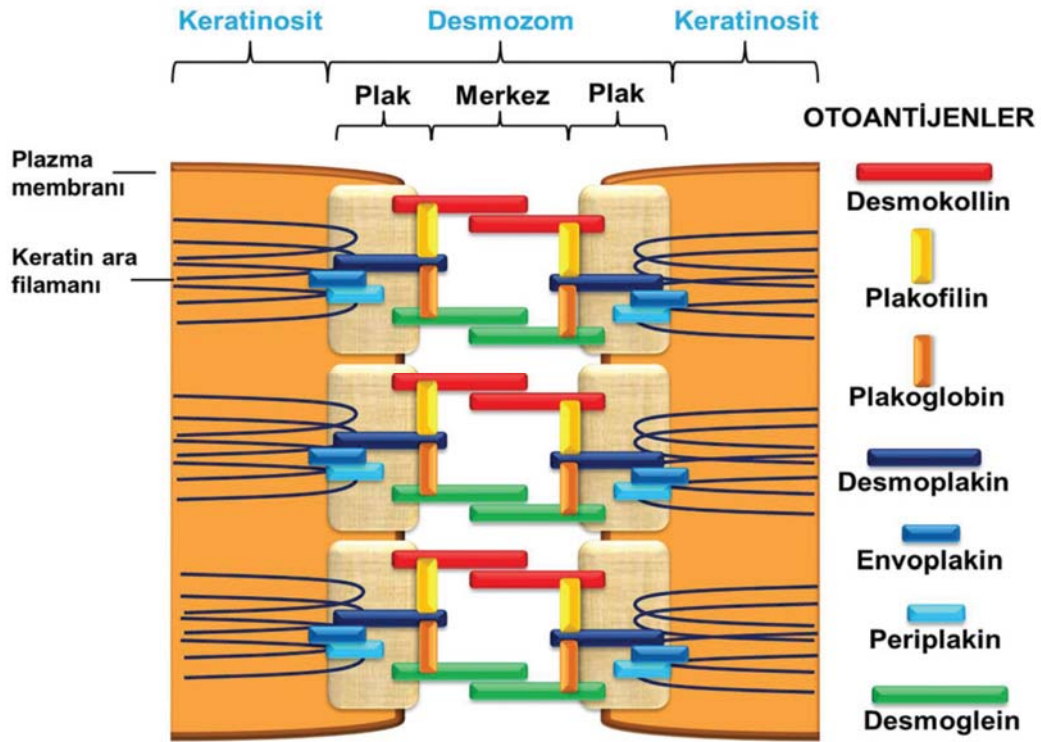
PV'deki otoantikorlar, Dsg3'ün 130-kDa PV antijeni olan daha çok ekstraselüler kısmını hedef alırken; PF'deki otoantikorlar Dsg1'in 160 kDa PF antijenini hedef alırlar (Bkz. Çizelge 2.2) (59). Keratinosit yüzeyinde bulunan kolinerjik reseptörler (alfa9-asetilkolin reseptörleri ve pemfaksin), desmokollinler ve Dsg4 antijenlerinin ise pemfigus patofizyolojisindeki direkt etkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (57,58).

PNP'de saptanan antijenik yapılar desmoplakin 1 (250-kDa), desmoplakin 2 (210-kDa), büllöz pemfigoid antijeni 1 (230-kDa), envoplakin (210-kDa), periplakin (190-kDa) ve alfa2 makroglobulin benzeri 1 proteindir (170-kDa). Ayrıca plektin (500-kDa), Dsg3 ve Dsg1'de hedef antijenler arasında yer almaktadır (60, 61).

PH'de Dsg1 ve Dsg3'ü hedefleyen IgG otoantikorlarının nötrofiller için kemoatraktan olan IL-8'in üretim ve sekresyonunu arttırdıkları ve nötrofillerin proteaz salınımı ile bül oluşumuna katkıda bulundukları düşünülmektedir. Bazı olgularda desmokollin antikorları da saptanmıştır (55).

IgA pemfigusunda hücre yüzey bileşenlerini hedefleyen IgA otoantikorları görülür. Hedef antijen subkorneal püstüler dermatoz (SPD) benzeri tipte desmokollin-1 (115-kDa) iken, intraepidermal nötrofilik (İEN) tipte tam bilinmemektedir. Bazı hastalarda Dsg1 veya Dsg3'e karşı gelişmiş IgA otoantikorları belirlenmiştir (55,60).

Dsg3 antijeni ekstraselüler 5 farklı kısımdan (EC1-5) oluşur. Özellikle EC2 epitopuna karşı gelişmiş IgG4 antikorlarının akantolizi indüklediği belirlenmiştir (62). Fakat bu otoantikorların akantolize nasıl yol açtığı net olarak açıklanamamıştır.

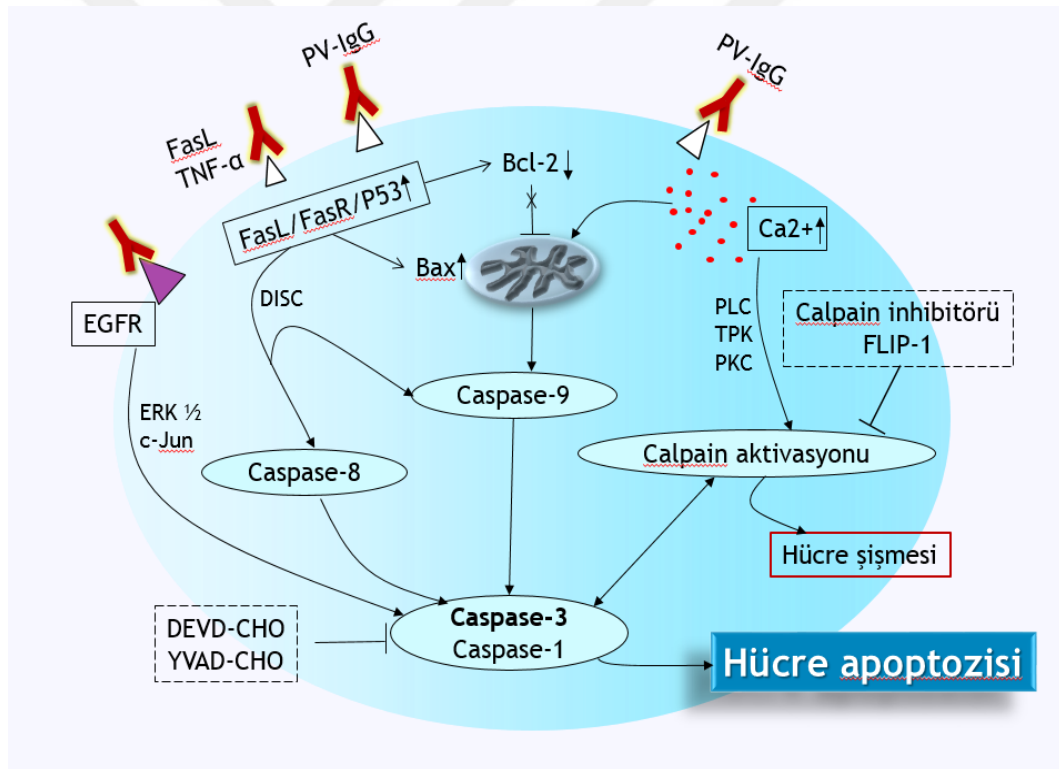


Şekil 2.1. Desmozomal adezyon molekülleri (Otoantijenler) (Prof Dr Soner Uzun'un izni alınarak konmuştur.)

Akantolizi açıklamak üzere öne sürülen hipotezlerden bir tanesi plazminojen aktivasyon hipotezidir. Bu hipoteze göre PV hastalığında oluşan IgG antikorları sinyal iletimini anormal derecede uyararak Dsg3'de fosforilasyona neden olur ve bu da Dsg3'ün plakoglobinden ayrılmasına yol açar. Bu durum desmozomal formasyonun hücre içinden bozulmasına neden olabilir. PV-IgG'si aynı zamanda ürokinaz tip plazminojen aktivatör (uPA) sekresyonu ve hücre yüzeyinde uPA reseptörü ekspresyonuna neden olan, protein kinaz C (PKC) ileti yolağını da uyarır. Böylece plazmin aktive olur. Bu uyarı ise hücre dış yüzeyinde bulunan desmozomların ayrılmasına olanak sağlayabilir. Bu iki farklı PV-IgG aracılı ileti yolağı PV'de akantoliz mekanizmasından sorumlu olabilir (63). Bir diğer görüşe göre antikorların desmogleindeki ve diğer adezyon moleküllerindeki bağlanma alanlarını fiziksel olarak bloke ederek (yapısal engelleme) işlevsel bozukluklara yol açabileceğidir (2,64). Proteolitik enzimlerin salınımının uyarılması da diğer bir olasılıktır (2). PV'de IgG'nin Fas-ligandı ve TNF- α

yardımıyla bazal hücre büzüşmesi yoluyla akantolizi induklediği (Şekil 2.2) ileri sürülmüştür (bazal hücre büzüşmesi ve apoptolizis teorisi) (65-67). Apoptotik sistemin pemfigus patogenezindeki rolü kabul edilmekle birlikte akantolizin apoptoz yokluğunda da gözlenebildiği bildirilmiştir (68). Antikolinerjik reseptörlere karşı gelişmiş antikorların da desmozomal kaderinleri etkileyerek akantolize yol açabileceği ileri sürülmüştür (63).

Son yıllarda ileri sürülmüş olan diğer bir mekanizma ise otoantikorların keratinositlerde epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) aktive ederek Fas apoptotik yolağının indüksiyonu (Şekil 2.2) ile akantolizi tetiklemeleridir (66,69). Ancak EGFR sinyal yolağının pemfigusta akantolize katkıda bulunmakla birlikte kritik öneminin bulunmadığı bildirilmiştir (70).



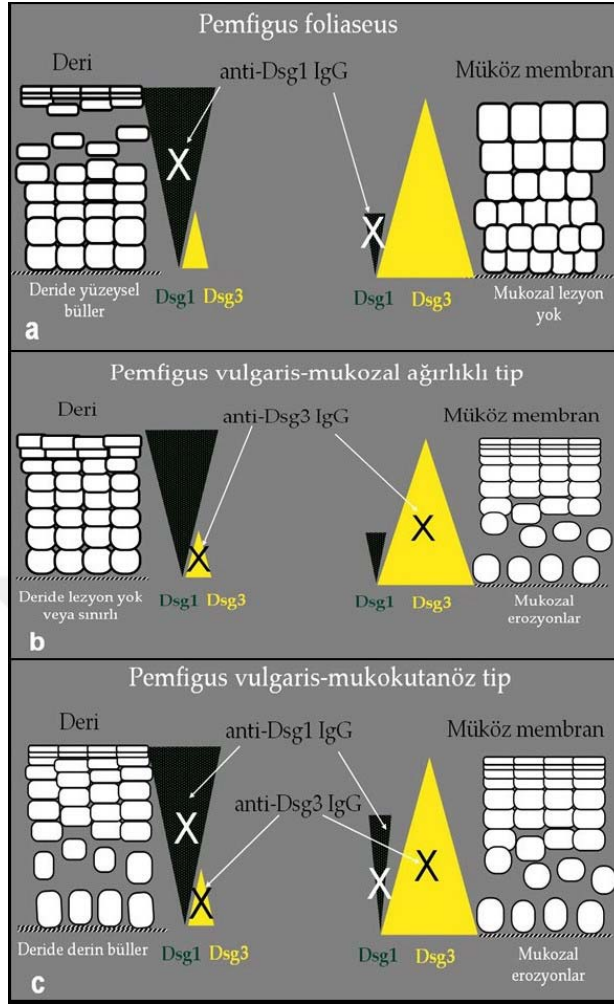
Şekil 2.2. Pemfigusta antikor nedenli hücre apoptozisi (Pan'dan, 66)

Dsg3 ve Dsc3 başlıca epidermiste bazal ve suprabazal tabakalarca eksprese edilirken, Dsg1 ve Dsc1 tüm epidermiste özellikle üst katmanlarda bulunur. Mukozada Dsg3 ekspresyonu tam kata yakın iken Dsg1 çok az bulunur.

(71). Farklı pemfigus formlarında lezyonların dağılımı, değişik desmoglein izoformlarının epidermisteki dağılımı ile uyumludur. Sadece Dsg3 antikoru olan PV'li hastalarda lezyonlar müköz membranlara sınırlıyken her iki desmozoma karşı otoantikoru olan hastalarda yaygın mukokutanöz lezyonlar görülmektedir (72).

Otoantikorların tipleri ile ayrışmanın olduğu anatomik lokalizasyonun karmaşık ilişkisi “*desmoglein kompensasyon teorisi*” olarak açıklanır (Şekil 2.3) (73). Desmoglein kompensasyon teorisine göre Dsg1 ve Dsg3 keratinosit adezyonunun sürekliliğini birlikte sağlarlar. Her ikisinin de eksprese edildiği alanlarda bir Dsg diğerrinin antikora bağlı işlev kaybını kompanse eder. Buna göre PV'de lezyonlar derin yerleşimlidir çünkü bu tabakalarda Dsg3'ü kompanse edebilecek Dsg1 yoktur. PF'de ise derinin yüzeysel tabakalarında Dsg1'e karşı gelişmiş antikör yanıtını kompanse edebilecek Dsg3 bulunmadığından lezyonlar yüzeyseldir (66,73).

PF'de olduğu gibi serumda sadece anti-Dsg1 IgG varsa bülleler sadece yüzeysel epidermiste ortaya çıkar. Çünkü burada Dsg1 fonksiyon bozukluğunu kompanse edecek seviyede Dsg3 bulunmaz. Epidermisin derin kısımlarında ise Dsg3 fonksiyonunu yitirmiş olan Dsg1'i kompanse eder ve böylece bu alanlar hastalıktan etkilenmez. Benzer şekilde mukozal alanlarda da Dsg1 ile birlikte Dsg3'ün neredeyse tam kat eksprese edilmesi nedeniyle anti-Dsg1 IgG bu bölgelerde bül oluşumuna yol açamaz. Serumda sadece anti-Dsg3 IgG bulunması durumunda ise deride Dsg3'ün yetersiz fonksiyonunu kompanse edecek Dsg1 bulunduğu için deride ya lezyon olmaz ya da sınırlı tutulum olur. Fakat mukozal yüzeylerde Dsg1 az eksprese edildiği için bu alanlarda tutulum daha belirgindir. Hem anti-Dsg1 hem anti-Dsg3 IgG'nin birlikte bulunduğu durumda ise mukokutanöz PV'de olduğu gibi hem deride hem de mukozada yaygın tutulum meydana gelir (74).



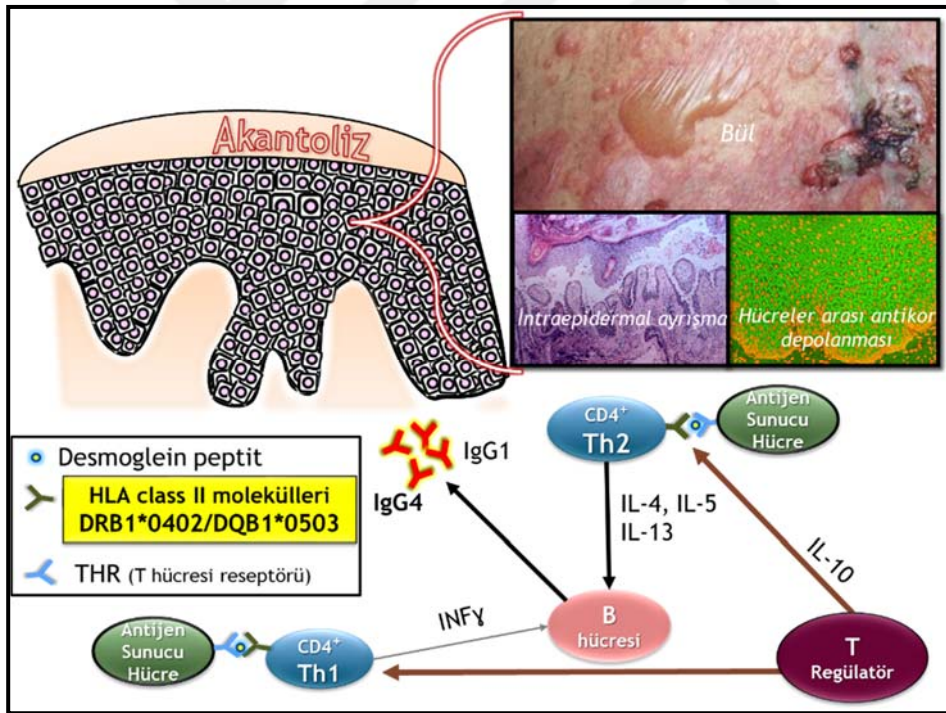
Şekil 2.3. Desmoglein kompensasyon teorisi. a) PF’de sadece Dsg1’e karşı gelişen antikorlar, **b)** PV’nin mukoza ağırlıklı tipinde sadece Dsg3’e karşı gelişen antikorlar, **c)** PV’nin hem mukozal hem kutanöz tutulum yapan tipinde hem Dsg1 hem Dsg3’e karşı gelişen antikorlar
(Prof. Dr. Soner Uzun’un izni alınarak konmuştur.)

Pemfigusta otoreaktif T hücreleri patojenik otoantikorların üretiminde B hücrelerine yardımcı olurlar (Şekil 2.4). Hastalardan elde edilen periferik T hücrelerinin çoğunluğunun CD4⁺ hafıza fenotipi, az bir kısmının da CD8⁺ reseptör taşıdığı belirlenmiştir (75).

Dsg3 reaktif Th1 hücreleri ilk olarak kronik aktif PV hastalarında ve PV ilişkili HLA class II alelleri taşıyan sağlıklı bireylerde saptanmıştır. Fakat sağlıklı bireylerde, PV hastalarından farklı olarak Dsg3 reaktif Th2 hücreleri yoktur (76).

PV'nin akut başlangıç fazında Dsg3 spesifik otoreaktif Th1 ve Th2 hücreleri benzer düzeyde saptanmıştır (77). Th2 hücre düzeylerinin akut, kronik aktif ve remisyondaki hastalarda benzer düzeylerde olduğu saptanırken; Th1 düzeylerinin kronik hastalarda Th2 düzeylerini aştığı belirlenmiştir (78). Aynı zamanda Th2 sitokinleri olan IL-4 ve IL-13 aktive B hücrelerinden IgG4 ve IgE salınımını düzenlerken, Th1 sitokini interferon gama (IFN- γ) ise IgG1 salınımını indükler. Yani Dsg3 reaktif Th2 hücreleri klinik olarak aktif pemfigusla doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle pemfigus vulgarisin ağırlıklı olarak Th2 hücreler tarafından yönlendirilen bir hastalık olduğu düşünülmektedir (79).

Th17 hücreleri, naif T hücrelerinin IL-23 ile stimülasyonu sonrası gelişen ve IL-17 sekresyonu ile karakterize bir T hücre alt tipidir. Th17 hücreleri PV'li hastalarda deri lezyonlarında saptanmış; fakat seviyeleri ne serum IgG otoantikor düzeyleri ile ne de hastalığın klinik şiddeti ile korele bulunmamıştır (80).



Şekil 2.4. Pemfigusta T ve B hücrelerinin rolü (Prof. Dr. Soner Uzun'un izni alınarak konmuştur.)

Tfh hücreleri, yeni tanımlanan bir CD4⁺ T yardımcı hücre alt tipi olup; germinal merkez formasyonu, afinite maturasyonu, yüksek afiniteli antikor gelişimi ve hafıza B hücrelerinin gelişimine yardımcı olarak humoral immünite için kritik rol oynamaktadır (81).

Tfh hücreleri ilk olarak germinal merkezlerin içerisinde bulunan, C-X-C kemokin reseptör tip 5 (CXCR5) eksprese eden aktive T hücreleri olarak saptanmışlardır. Yapılan gen ekspresyon analizleri sonucunda Tfh hücrelerinin transkripsiyon profili diğer efektör CD4⁺ T hücrelerinden farklı görülmüştür. Tfh hücreleri, CXCR5 ve diğer farklı moleküllerin yanı sıra, BCL-6, indüklenabilir T hücre kostimülatör (ICOS), SLAM-ilışkili protein (SAP), CD84 gibi molekülleri yüksek oranda eksprese etmektedir. Farelerde bu moleküllerden herhangi birinin eksikliğine bağlı oluşan T hücre yetersizliği sonucunda bozuk germinal merkez formasyonu ve defektif antikor cevabı meydana geldiği görülmüştür. T hücrelerinde artmış BCL-6 ekspresyonu ise CXCR5⁺ ve programlı hücre ölümü 1 (PD1)⁺ T hücrelerin gelişimini arttırmaktadır. Aynı zamanda immünizasyonu takiben T hücrelerindeki CXCR5 ekspresyonu, Th1/Th2/Th17 için kritik olan sitokin ya da transkripsiyon faktörlerine daha az bağımlıdır. Ayrıca BCL-6'nın fazla ekspresyonu Th1/Th2/Th17 diferansiyasyon programlarını baskılayabilir. Bütün bu gözlemler Tfh hücrelerinin farklı bir hücre grubu olduğunu, gelişiminin ve fonksiyonlarının diğer efektör hücre tiplerinden bağımsız olduğunu desteklemektedir (82).

CXCR5, CXCL13'ü bağlayan ve Tfh hücrelerinin B hücre folikülüne doğru olan migrasyonunda önemli role sahip bir reseptördür ve Tfh hücreleri için esas belirleyici olarak kabul edilmektedir (82).

CXCR5 artışı aktive olmuş T hücrelerini T-B sınırına götürmeye yetse de T hücrelerini folikül içerisine sokmak için yeterli olmamaktadır. ICOS, CD28 ailesine dahil olan ko-stimulatuar bir moleküldür. Aktive T hücrelerinde up-regülasyona uğrar ve Tfh hücrelerinde yüksek oranda bulunur. ICOS, T-bağımlı B hücre yanıtında gerekli bir molekül olup eksikliği germinal merkez yapısında bozukluğa neden olur. CXCR5 yüksek oranda eksprese edilse de; ICOS eksikliği olan T hücrelerinin foliküler yer değişiminde defekt olduğu saptanmıştır. Özellikle T-B sınırında ve muhtemelen folikül içerisindeki yer değişimine katkıda

bulunduğu düşünülmektedir. ICOS sinyali IL-21 yapımını uyarabilir ve bu da Tfh hücre gelişimini otokrin olarak artırır ve B hücre yanıtını destekler. Ayrıca aktive T hücrelerinde optimal CXCR5 up-regülasyonu için ICOS kostimulasyonu gereklidir (82).

Antijen spesifik T ve B hücrelerinin T-B sınırında ya da folikül içerisinde birlikte yer almaları aralarındaki fiziksel iletişim olasılığını arttırmaktadır. SAP, SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) ailesinden olan transmembran bir proteindir. SAP eksikliği, bozulmuş germinal merkez cevabı ve humoral immüniteye yol açmaktadır. SAP eksikliği olan T hücrelerinin invivo olarak B hücreleri ile stabil bir etkileşim kuramadığı gözlenmiştir. Tfh hücrelerinin germinal merkez reaksiyonunu desteklemeleri için germinal merkez içinde bulunmaları gerekmektedir. SAP molekülü de Tfh hücrelerinin germinal merkeze girmesi ve buraya yerleşmesi için gereklidir. Germinal merkezdeki Tfh hücrelerinde SAP molekülünün daha fazla eksprese edilmesinin nedeninin de bu olduğu düşünülmektedir (82).

Başta germinal merkez evresindekiler olmak üzere, Tfh hücreleri yüksek oranda PD1 eksprese etmektedirler. PD1, CD28 ailesinden olan bir ko-inhibitör olup, aktivasyonla birlikte T hücrelerinde hızla eksprese edilmeye başlanır. PD1 sinyalleri T hücre ve antijen sunan hücreler arasındaki etkileşimleri azaltarak periferik tolerans sağlar (82). Tfh hücrelerindeki bu inhibitör yolağın rolü tam olarak bilinmese de PD1 veya ligandındaki eksiklikleri olan farelerde yapılan analizler, PD1'in, germinal merkezdeki B hücre döngüsünde ve hafıza B hücre formasyonunda rol aldığını desteklemektedir (83).

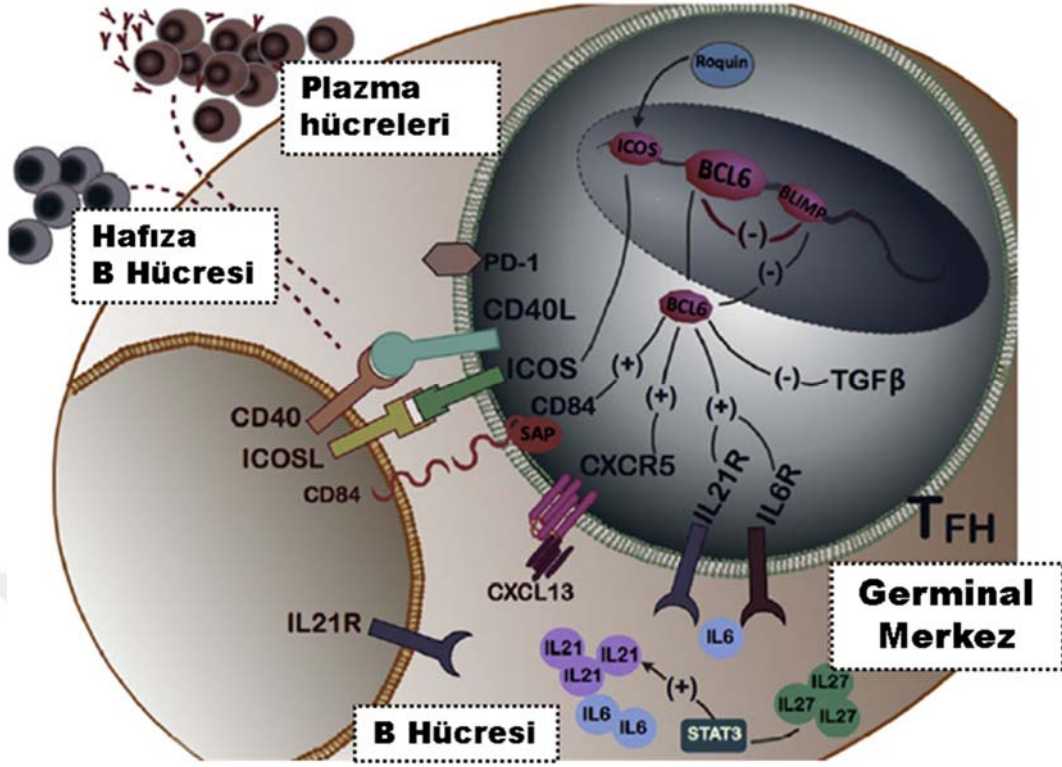
BCL-6, Tfh hücreleri için en önemli transkripsiyon faktörüdür. Dentritik hücrelerin T hücrelerini uyarmasından 2-3 gün sonrasında BCL-6, T hücrelerinde up-regülasyona uğrar. BCL-6'nın yüksek ekspresyonu CXCR5 transkripsiyonunu arttırmaktadır. Ek olarak BCL-6'nın Tfh hücrelerini düzenleyici rolünün sadece kritik genlerin regülasyonu üzerinde değil aynı zamanda Th1/Th2/Th17 diferansiyasyonlarını da süprese ederek rol oynayabileceği hakkında düşünceler mevcuttur (82).

IL-6, Tfh hücre gelişiminde önemli bir sitokin olup yeni aktive olmuş CD4⁺ T hücrelerde geçici olarak BCL-6 ekspresyonunu uyarır. IL-6 eksikliğinde Tfh

hücrelerinin diferansiyasyonunda erken defekt saptanmıştır. Ek olarak IL-6'nın aktive olmuş murin CD4⁺ T hücrelerinden IL-21 yapımını uyaran potent bir indükleyici olduğu bilinmektedir (81). IL-21 ise Tfh hücre gelişiminin ve fonksiyonunun regülasyonunda temel sitokin olarak kabul edilmektedir. Otokrin şekilde fonksiyon gösteren ve kostimulasyonu CD40-CD40L etkileşimi ve ICOS'a bağımlı olan bir sitokindir. IL-21 ayrıca plazma hücre diferansiyasyonunda ve farklı antikör tiplerinin üretiminde rol oynamaktadır (84).

Tfh hücrelerinin regülasyonunun ve regülasyonda görev alan bu moleküllerin rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Şekil 2.5'te Tfh hücreleri ve germinal merkezdeki ilgili mekanizmalar özetlenmiştir.

Tfh hücrelerinin çeşitli otoimmün hastalıklarda rol oynayabileceğini destekleyen çalışmalar mevcuttur (8,9,85-87). Fakat Tfh hücrelerinin otoimmün bülöz hastalıklarındaki rolü hakkında çok az bilgi mevcuttur. Yeni yapılan bir çalışmada, pemfigus hastalarında dolaşımdaki CD4⁺CXCR5⁺ Tfh hücreleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır (10). Diğer bir çalışma ise bülöz pemfigoid hastalarında yapılmış olup hasta grubunda periferik kandaki Tfh hücre oranları sağlıklı kontrollere göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır (88). Tfh hücrelerinin otoimmün bülöz hastalıklarda rol oynadığını destekler bulgular olsa da bu rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.5. T_{fh} hücreleri ve germinal merkezdeki moleküler mekanizmalar (Gomez-Martin'den, 84).

2.5 Klinik

PV, PVeg derin; PF, Fogo selvagem ve PE yüzeysel pemfigus formlarıdır. PNP, ilaç ile indüklenen pemfigus, IgA pemfigusu ve PH ise nadir görülen pemfigus formlarıdır (89). Lezyonların dağılımı ile hastalık oluşumunda rol oynayan otoantikorların hedef aldığı antijenlerin dağılımı arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Pemfigus lezyonları saçlı deri, yüz ve üst gövde gibi antijen yoğunluğunun daha fazla olduğu bölgelerde daha sık bulunurken, antijen yoğunluğu düşük olan bacaklarda nadiren görülür (16).

Akantolizin klinik karşılığı olan Nikolsky belirtisi başta pemfigus olmak üzere toksik epidermal nekroliz ve stafilokokal haşlanmış deri sendromu gibi intraepidermal büllü hastalıklarda pozitif iken büllöz pemfigoid gibi subepidermal büllü hastalıklarda negatiftir. Büllün çatısından veya kenarındaki büll artığından yukarıya doğru çekildiğinde, deri boyunca sıyrılabilmesi ya da kenarındaki normal görünümlü deriye burğu biçiminde bastırıldığında erozyon oluşması

marjinal Nikolsky belirtisi; bül veya erozyondan uzaktaki normal görünümlü deriye burğu biçiminde bir bası uygulandığında erozyon oluşması ise direkt Nikolsky belirtisi olarak bilinmektedir. Marjinal Nikolsky belirtisi yüksek bir sensitiviteye, direkt Nikolsky belirtisi düşük sensitivite fakat oldukça yüksek bir spesifiteye sahiptir (90). Uzun ve arkadaşları marjinal Nikolsky belirtisinin sensitivitesini %69, spesifitesini %94, direkt Nikolsky belirtisinin ise sensitivitesini %38, spesifitesini %100 olarak saptamışlardır (91). Prognostik değeri de olan Nikolsky belirtisinin tedavi sürecinde negatifleşmesi remisyonun işareti sayılırken, tedavi sonrası pozitifleşmesi ise klinik olarak bir nüksün habercisi olabilmektedir (2,91).

2.5.1 Pemfigus Vulgaris

PV'de, sıklıkla ilk olarak müköz membranlar etkilenir, sonrasında aylar içinde deri lezyonları gelişir. Büller kolaylıkla rüptüre olabildiği için hastalık genellikle oral kavitede tipik olarak çok sayıda, ağrılı, yüzeysel iyileşmeyen ülserasyonlarla başlar (92). En çok etkilenen yerler bukkal ve labial mukoza, damak ve dildir. Erozyonlar periferde doğru uzanabilir, farinks ve larinkse yayılarak ses kısıklığı, yeme ve içme zorluğuna neden olur. Nazal mukoza tutulumunda ise nazal konjesyon, müköz burun akıntısı ve epistaksise yol açabilmektedir. Laringeal ve nazal lezyonlar bilinenden daha sıktır (89,93). Etkilenen diğer mukozal yüzeyler arasında konjonktiva, özefagus, vulva, serviks, üretra ve rektal mukoza yer almaktadır (94-96).

Hastalığın klinik seyrinde oral mukozada oluşan lezyonlar 4-8 ay arasında değişen bir süre içerisinde deride görülmeye başlar (2,23). Derideki primer lezyonlar gevşek büller olup içi temiz bir sıvıyla doludur, normal veya eritematöz deride görülür ve ağrılı erozyonlar bırakarak kolayca yırtılır. Tedavi edilmediğinde, erozyonlar büyük soyulmuş alanlar oluşturur, kabuklanabilir, enfeksiyon ve metabolik bozukluklarla komplike olabilir. Büller her yerde meydana gelebilir, fakat saçlı deri, üst gövde ve sırt en sık etkilenen yerlerdir, yüzde ve boyunda da görülebilir. Gövdenin orta hattı etkilenmeye daha eğilimlidir. PV'de %40'a varan oranlarda tırnak tutulumu görülmektedir. En

yaygın tırnak tutulumu kronik paronişi ve onikomadezistir (97, 98). Paronişi pemfigusun ilk bulgusu veya hastalığın alevlenme belirtisi de olabilmektedir (99).

PV'nin %7 ile %24 arasında değişen oranlarda, erozif deskuamatif gingivostomatit tablosu şeklinde oral mukozaya sınırlı kalarak, deride lezyon oluşturmada devam ettiği bildirilmiştir (23,100,101). Kliniğin oral mukoza ile sınırlı kaldığı hastalarda tanının gecikmesine sık rastlanması nedeniyle, bir aydan uzun süredir iyileşmeyen, özellikle birden çok oral ülserin varlığında pemfigus vulgaris akla gelmelidir (2,23,89,102).

Tedavisiz bırakıldığında bül ve erozyonlar çevreye doğru yayılma gösterir ve tıpkı yanıklarda görüldüğü gibi ölümle sonuçlanabilen ciddi enfeksiyon ve metabolik bozukluklara yol açabilir. Sistemik steroidler tedavide kullanılmaya başlanmadan önce hastaların yaklaşık %75'i bir yıl içerisinde ölmekteydi. Günümüzde ise gelişmiş tanı yöntemleri ve uygun tedavi yaklaşımları sayesinde çok şiddetli hastalıklarda bile klinik seyri kontrol altına alabilmek mümkün olmaktadır (2).

Tedavi ile PV lezyonları genellikle skar bırakmadan iyileşir. Ancak geçici bir rezidüel hiperpigmentasyon görülebilir. Hastalığın hafif formları spontan gerileme gösterebilir (89).

2.5.2 Pemfigus Vejetans

PVeg, PV'nin daha az agresif bir varyantı olup, verrüköz ve papillomatöz vejetasyonlara dönüşme eğiliminde olan bül ve püstüllerle karakterizedir (2,89). Vejetan lezyonlar tipik olarak kıvrım bölgelerinde (aksilla, inguinal bölge, meme altı) olma eğilimindedir. Saçlı deri, yüz ve mukozalarda da lezyonlar görülebilmektedir (57). Neumann tipi ve Hallopeau tipi olmak üzere iki klinik formu vardır. Daha şiddetli bir klinik seyir gösteren Neumann tipinde vejetasyonlar erozyonlar üzerinde gelişir ve daha yaygın olarak görülürken, Hallopeau tipinde daha çok püstüller izlenmektedir ve lokalize olma eğilimindedir. Oral mukoza tutulumu Hallopeau tipinde oldukça nadirdir. Lezyonlar sekonder enfeksiyonun da eklenmesiyle tedaviye oldukça dirençli olabilmektedir (90).

2.5.3 Pemfigus Foliaseus

PF pemfigusun yüzeysel varyantıdır. Akantoliz subkorneal tabakada olduğu için genellikle büller kolayca rüptüre olur ve sağlam bül görmek mümkün değildir. PF’de lezyonlar; gövdenin üst kısmı, yüz ve saçlı deri gibi seboreik bölgelerde daha sıktır. Skuamlı ve krutlu rekürren erozyonlar ile kendini gösterir. Erken dönemde PF, seboreik dermatiti taklit edebilir. Dsg1’in oral mukozada az bulunması nedeniyle PV’nin aksine oral mukoza tutulumu oldukça nadirdir. Mukozal tutulum olmaması nedeniyle prognozu genellikle PV’den daha iyidir. Fakat ileri vakalarda ciddi eksfoliasyon görülebilir ve klinik görünüm eksfoliatif eritrodermaya benzeyebilir. PF’nin fogo selvagem ve pemfigus eritematozus olmak üzere iki varyantı vardır (89,102).

2.5.4 Fogo Selvagem (Brezilya PF, Endemik Pemfigus)

Bu pemfigus formu Güney Amerika başta olmak üzere (Brezilya) dünyanın bazı kırsal alanlarında endemik olarak görülür. Sıklıkla genç erişkinlerde görülen bu hastalığın klinik, patolojik ve immünopatolojik olarak PF’den ayrılması mümkün değildir (103).

2.5.5 Pemfigus Eritematozus

Aynı zamanda hastalığı ilk defa tanımlayan yazarların adı olan Senear-Usher sendromu olarak da adlandırılmaktadır. PE’de lezyonlar daha çok güneş gören yerler olan yüz ve gövdenin üst kısmına lokalizedir. Klinik lezyonlar eritematöz, skuamlı, hiperkeratotik yüzeysel erozyonlar ile karakterizedir ve sıklıkla kelebek şeklinde dağılım görüldüğü için kutanöz lupus eritematozusu andırabilir. PE’li hastaların %30’unda düşük titrasyonda ANA pozitifliği gözlenirken, %80’inde lupus bant testi pozitifliği saptanması ve direkt immünfloresan (DİF) incelemede intersellüler alanda IgG ve C3 depolanmasına ilaveten özellikle güneş gören bölgelerden alınan biyopsilerde genellikle dermo-epidermal bileşkede granüler immünoglobulin ve/veya kompleman birikimi olması; PE’nin pemfigus ve lupus eritematozus arasında bir crossover sendromu olabileceği sorusunu açığa çıkarmıştır (2,89,90,104). Tam tersine PE ve lupusun birlikte olduğu nadir vakalar da bildirilmiştir (2,89).

2.5.6 Paraneoplastik Pemfigus

1990 yılında Anhalt ve arkadaşları tarafından beş hastada klinik, histopatolojik ve immünolojik özellikler ile eşlik eden neoplaziler ortaya konulmuş ve bu tablo, PNP olarak adlandırılmıştır (13). Epitel ve iç organları hedef alan, çoklu organ tutulumu ile giden otoimmün bir sendrom olarak değerlendirilmektedir (105). Bu pemfigus formunda klinik tablo değişken olmakla birlikte genellikle şiddetli mukozal erozyonlar ile başlar. Dudakların hemorajik krutlu erozyon ve ülserasyon gösteren görünümü tipiktir. Lezyonlar genellikle ağrılıdır ve tedaviye dirençlidir. Farinks, larinks, özefagus, konjonktiva, nazal ve genital bölge mukozalarının tutulumu pemfigusun diğer formlarından daha sık görülmektedir (106). Klasik pemfigusta bronşiyol ve alveolar hava yollarında tutulum görülmezken PNP’li hastalarda %30-40 oranında bronşiyal epitelin akantolizi sonucu gelişen pulmoner hasar (bronşiolitis obliterans), infeksiyonların da eklenmesiyle fatal seyredebilmektedir (107,108). Deri lezyonları ise büller, erozyonlar, likenoid papüller, hedef tahtası benzeri lezyonların eşlik edebildiği polimorfik bir deri döküntüsü görünümündedir. Deri lezyonları sıklıkla eritema multiforme ve toksik epidermal nekrolize benzer, büllöz pemfigoid, liken planus, liken planus pemfigoides, hatta kronik graft-versus-host hastalığına benzer vakalar da bildirilmiştir. Palmoplantar bölgede yerleşen büller ve likenoid lezyonlar, bu bölgeyi nadiren tutan PV’den ayırmada önemli bir ipucudur. Kronik likenoid erüpsiyonu olan hastalarda ise sıklıkla ağrılı, ülseratif paronişiyal lezyonlar görülebilmektedir (60,108).

PNP’li hastaların yaklaşık 2/3’ünde deri lezyonları, neoplazm ile birlikte gözlenirken, 1/3’ünde ise neoplazm, mukokütanöz hastalık oluşuktan sonra saptanır. Bu yüzden klinik olarak PNP düşünülen olgularda toraks, abdomen, pelvik bilgisayarlı tomografi gibi ayrıntılı inceleme yöntemleri kullanılmalıdır (60). Eşlik eden neoplaziler başta non-Hodgkin lenfoma olmak üzere kronik lenfositik lösemi, Castleman hastalığı ve Waldenström makroglobulinemisi gibi lenfoproliferatif hastalıklardır. Nadiren sarkom, karsinom (akciğer ve hepatoselüler), timoma gibi solid organ neoplazileri görülebilmektedir (109,110).

1993 yılında Camisa ve Helm tarafından PNP için tanı kriterleri oluşturulmuştur (Çizelge 2.4). Buna göre tanı için 3 majör veya 2 majör ve 2

minör kriter gerekmektedir (111). PNP'ye eşlik eden neoplazinin tedavisi sonrasında klinik iyileşme olabilse de hastaların büyük bir çoğunluğunda progresif klinik seyir göstererek sıklıkla fatal seyretmektedir (112,113).

Çizelge 2.4. Camisa ve Helm tarafından PNP tanısı için önerilen tanı kriterleri (111)

Major kriterler • Polimorfik kutanöz döküntü • Eşlik eden internal neoplazi • Serumda spesifik immünopresipitasyon paterni
Minör kriterler • Histolojik olarak akantoliz gösterilmesi • Direkt immünfloresan (DİF) incelemede IgG ve C3 ile intersellüler ve bazal membranda depolanma • Substrat olarak sıçan mesanesinin kullanıldığı indirekt immünfloresan (İİF) incelemede intersellüler depolanma (desmoplakin antikörleri)

2.5.7 IgA Pemfigusu

Wallach ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1982 yılında tanımlanan ve pemfigus grubu içerisinde nadir görülen bir antidedir. Daha çok gövdenin alt yarısını, proksimal ekstremiteleri ve kıvrım alanlarını tutan eritematöz zeminde vezikülopüstüller lezyonlar ile karakterize olup adını intersellüler aralıkta depolanan IgA immünoglobulin tipinden almaktadır. İEN dermatoz ve SPD olarak iki tipi bulunur. Her iki tipinde de püstüller, ortasında krutların olduğu anüler ya da sirsine biçimli lezyonlar oluşturmak üzere birleşme eğilimi gösterirler. Aynı zamanda püstüllerin ayçiçeğine benzer görünümde dizilimleri İEN dermatoz tipinin karakteristik bir bulgusudur. Mukozal tutulum nadir olarak görülür. Kaşıntı hastaların günlük yaşamını etkileyen önemli bir semptomdur.

IgA pemfigusunun SPD alt tipi ile klasik SPD, klinik ve histopatolojik olarak birbirlerinden farksız olduğu için ayırmak için immünolojik değerlendirme zorunludur (74,90). Ayrıca IgA pemfigusunun Monoklonal IgA gamopatisi ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi)

yanında Sjögren sendromu ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar ile de ilişkisi bildirilmiştir (102).

2.5.8 Pemfigus Herpetiformis

PH, kaşıntılı olması, histopatolojik olarak eozinofillerin ve/veya nötrofillerin varlığı ve sülfonlara yanıt verme eğilimi ile pemfigusun farklı bir formu olarak tanımlanmıştır. PH, dermatitis herpetiformisin klinik özellikleri ile pemfigusun immünolojik ve histolojik özelliklerinin kombinasyonudur. İn vivo dolaşan ve keratinositlere bağlanan IgG otoantikörlerin hedef antijenleri hastaların çoğunda Dsg1 geri kalanında Dsg3'tür. Bu antikor profili PH'nin klasik bir pemfigus formu olduğunu göstermektedir (114). Hastaların çoğu PF'nin, geri kalanlar da PV'nin klinik görünümündedir. PH'nin klinik görünümü özgün değildir, herpetiform özellik gösteren, eritemli zeminde gelişmiş vezikül, bül veya papüller görülür. Mukozal tutulum nadirdir. Şiddetli kaşıntı sıklıkla eşlik eder. Klinik olarak dermatitis herpetiformis, büllöz pemfigoid, lineer IgA dermatozu, PF başta olmak üzere birçok büllü hastalığı taklit edebilmektedir (60).

2.5.9 İlaç İlişkili Pemfigus

Klinik ve laboratuvar özellikleri idyopatik pemfigus ile aynı olan pemfigusun iyi tanımlanmış bir varyantıdır. 1950'lerin başlarında penisilin tedavisini takiben, 1960'lı yıllarda da Wilson hastalarında penisilamin kullanımı sonrasında aktive olan pemfigus olguları bildirilmiştir. En çok sorumlu tutulan ilaçların başında penisilaminler gelir. Ancak ilaç ilişkili pemfigusa birçok ilaç neden olabilir. Bu ilaçlar tiyol grubu (penisilamin, kaptopril, enalapril) ve tiyol grubu içermeyen ilaçlar (penisilinler, sefalosporinler, piroksikam) olarak sınıflandırılabilir (115). Tiyol ilaçlar ile aylar içinde, non-tiyol ilaçlarla haftalar içinde başlayan klinik tablo, başlangıcında yaygın ürtikeryal, morbiliform tipte ilaç erüpsiyonu benzeri bir döküntü ile ortaya çıkmaktadır (115,116). Tiyol ilaçlar nedeniyle gelişen pemfigus hastaların üçte ikisinde klinik olarak PF'ye benzer, non-tiyol ilaçlar ise oral mukoza tutulumu yaparak PV tipine benzer tablolar oluşturmaktadır. Şüpheli ilacın kesilmesi ile tiyol ilaçlara bağlı pemfigusta %40-

50 oranında, non-tiyol ilaçlara bağlı pemfigusta ise %15 oranında spontan iyileşme gözlenmektedir (115).

2.6 Tanı

Pemfigusun tanısı; klinik, histopatolojik ve immünolojik incelemeler sonucu konulur (89). Işık mikroskopisinde intraepidermal ayrışma ve akantolitik hücrelerin gösterilmesi pemfigus tanısını kesin olarak koydurmaz; tanıda altın standart deride biriken otoantikorların DİF ile gösterilmesidir (117).

2.6.1 Sitoloji

Sitoloji hücrelerin karakteristik özelliklerini incelemeye dayalı bir tanı yöntemidir. Hızlı, ucuz, nispeten ağrısız ve tekrarlanabilir olması ve biyopsi almanın güç olduğu bölgelerde kullanılması avantajlarıdır (118).

Tzanck yayma, pemfigus tanısında kullanılan ancak histolojinin yerini alamayan bir ön tanı testidir. Sağlam bül ile vezikül sıvısından veya erozyon, ülser tabanından alınan kazıntı materyalinden hazırlanan yaymalar Giemsa ile boyanır. Mikroskopik incelemede akantolitik keratinositlerin (yuvarlak, nükleus-sitoplazma oranı normal keratinositlere göre artmış, perinükleer halonun olduğu, hiperkromatik nükleuslu hücreler) görülmesi pemfigusa işaret eden (%90 pozitif) bir bulgudur. Az sayıda iribaş (tadpole) hücresi pemfigusta gözlenebilmekle birlikte pemfigus herpetiformiste ve spongiotik dermatitte de gözlenebilir (119).

Pemfigusta özellikle kronik lezyonlardan yayma yapıldığında akantolitik hücreyi fagosite etmiş multinükleer dev hücreler görülebilir. Bu dev hücreler akantolitik tip skuamöz hücreli karsinomada da rapor edilmiştir (120).

Pemfiguslu hastalarda sitolojik incelemede gözlenen inflamatuvar hücreler çoğunlukla nötrofil ve eozinofillerdir. Bu inflamatuvar hücreler adezyon molekülleri sayesinde keratinositler çevresinde rozet şeklinde (Sertoli'nin rozet formasyonu) yerleşebilir veya zincir şeklinde (streptosit) birbirlerine tutunabilir. Bu bulgular pemfigusa özgü değildir. Rozet formasyonu herpetik enfeksiyonların %25'i ve diğer vezikülobüllöz hastalıkların %10'unda, streptositler ise pemfigoid grubu hastalıklarda gözlenir (118,121).

2.6.2 Histopatoloji

PV hem intraepidermal ayrışmanın hem de akantolizin çok belirgin izlendiği, akantolitik hastalık olarak prototipik olarak değerlendirebileceğimiz bir hastalıktır. Akantoliz genellikle bazal hücre tabakasının hemen üzerinde (suprabazal) olmaktadır. Komşu hücreler ile yan bağlarını kaybeden bazal keratinositlerin hemidesmozomlar aracılığı ile bazal membrana tutunmayı sürdürerek oluşturdukları görüntü “mezar taşı sırası” olarak adlandırılır (122). Akantoliz bül alanı içinde ve çevresinde yaygın olarak izlenir. Bül içerisinde, bül kavitesine düşmüş akantolitik hücreler görülür. Akantoliz kıl foliküllerini de içerebilir. Dermiste ise orta şiddette perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu ve eozinofil vardır. Nadir olarak en erken bulgu akantolizin belirsiz olduğu ya da hiç olmadığı epidermiste spongiotik alanlarda ve bül içerisinde eozinofillerin bulunduğu eozinofilik spongiotik tablosudur (74).

PV’de bu PV’deki histolojik morfolojiye ek olarak belirgin papillamatoz, akantoz ve hiperkeratoz görülür. Epidermal ayrışma PV kadar yaygın izlenmez. Karakteristik olarak çok sayıda eozinofil içeren yoğun bir inflamatuvar hücre infiltrasyonu vardır ve sık olarak intraepidermal mikroapseler görülür (74).

PF’de ayrışma alanı PV’ye göre daha yüzeyseldir. Bül subkorneal tabakada oluşum gösterir. Akantoliz granüler tabakada yani üst epidermistedir. Bir biyopside subkorneal ayrışma, akantolitik hücrelerin varlığı ve eozinofilik spongiotik izlenmesi ve/veya granüler tabakada diskeratotik keratinositlerinin varlığı pemfigus foliaceus’u düşündürmelidir. PE ve fogo selvagemde histolojik değişiklikler PF ile benzerdir. PE’de ek olarak bazı olgularda arayüz (interface) dermatiti tabloya eklenebilir (123).

PH’de eozinofilik spongiotik sıklıkla gözlenir. Seyrek olarak akantolitik hücre varlığı vardır. Ancak nötrofillerin infiltrasyonda yer alması ve intraepidermal püstül oluşumu da görülebilen bulgular arasındadır (124).

PNP’de deri lezyonları polimorfik olduğu için histopatolojisi spesifik değildir. Deri biyopsisi değerlendirilirken alınan materyalin klinik morfolojisi de göz önünde bulundurulmalıdır. İnflamatuvar olmayan kutanöz büller suprabazal akantoliz, arayüz dermatiti ve likenoid değişiklikler açısından baskınken,

eritematöz papül ve maküler lezyonlarda arayüz dermatiti ve likenoid değişikliklerle beraber tek hücre nekrozları, diskeratotik keratinositler, lenfositlerin ekzositozu ve bazal hücre dejenerasyonu gözlenmektedir. Eritrosit ekstrasvazasyonu, melanin inkontinansı da gözlenebilir (2,106).

IgA pemfigusunun karakteristik histolojik özelliği intraepidermal püstül veya vezikül oluşumudur. Püstül içeriği genel olarak nötrofilden oluşur. Akantoliz minimaldir. SPD tipinde püstüller subkorneal olarak üst epidermise yerleşirken İEN dermatoz tipinde alt epidermisi tutan suprabaziller ya da tüm epidermisi kaplayan püstüller gözlenir (74).

İlaca bağlı pemfigusun histopatolojisi klinik görünümü ile ilişkilidir. PF'ye benzer lezyonlarda subkorneal akantoliz, PV'ye benzer lezyonlarda ise suprabazal akantoliz gözlenir. Malpighi tabakasında hücreler arası ödem ve spongios ile nötrofil ve eozinofil infiltrasyonu görülür. Bazen mikroapseler oluşabilir. Dermiste damarlar çevresinde eozinofilden zengin bir infiltrasyon bulunur. İdiopatik ve ilacın başlattığı pemfigusu histopatolojik olarak ayırmak mümkün değildir (125).

2.6.3 İmmü Floresan Yöntemler

Flourescein ile işaretli antikorların dokudaki hedef antijene bağlanıp floresan mikroskopik inceleme ile görünebilir hale gelmesine dayanan bir testtir. Pemfigusun da içinde yer aldığı otoimmün büllöz hastalıklarda altın standart tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır (117,126,127). Günümüzde ototantik testleri içerisinde en sık kullanılandır. Temel olarak DİF ve İİF şeklinde iki yöntem ile uygulanırlar. DİF deri örneklerinde depolanmış antikorların varlığını, İİF ise serumda dolaşan antikorların varlığını ortaya koyar. DİF'de doku örnekleri doğrudan fluorescein konjugat ile enkübe edilirken, İİF'de seri dilusyonları yapılmış serum örnekleri önce bir ara doku (substrat) ile (maymun özefagusu, normal insan derisi veya sıçan özefagusu gibi) ardından da fluorescein konjugat ile enkübe edilir. Hazırlanan preparatlar ultraviyole mikroskobu ile incelenir (128).

a) Direkt İmmüfloresan Bulgular

Bütün pemfigus grubu hastalıklar DİF'te intersellüler aralıkta (İSA) immünreaktan depolanması (balık ağı görünümü) gösterirler. İSA depolanması pemfigus için karakteristik DİF bulgusudur. Aktif pemfigus hastalarında perilezyonel alınan biyopsi örneğinde DİF testinin sensitivitesi %100'e yakındır. IgA pemfigusu dışında bütün pemfigus tiplerinde IgG depolanır. IgG depolanmasına kompleman (C3) depolanması eşlik edebilir; fakat baskın IgG alttipi kompleman fikse etmeyen IgG4 olması nedeniyle, C3 depolanması her zaman gözlenmeyebilir (74). İSA depolanması genellikle epidermin tüm katlarında görülür; fakat PV'de suprabazal tabakada depolanma ve PF'de ise subkorneal tabakada depolanma daha yoğun olarak görülebilir. İSA'da tek başına IgA depolanması ise IgA pemfigusuna işaret eder (117).

İSA'ya ek olarak bazal membran zonunda (BMZ) IgG depolanması PE ve PNP'de görülür. Bu iki durum birbirinde histopatolojik bulgular ile ayrılır. Eğer ayrışma üst epidermiste ise PE, suprabazal ise PNP'dir (129).

İlaca bağlı pemfigusta depolanma paterni heterojendir. Bu hastaların yaklaşık olarak 2/3'ünde Dsg1'e karşı antikor vardır ve klinik ve histolojisi PF'ye benzer; 1/3'ünde ise Dsg3'e karşı antikor vardır ve bu hastaların klinik ve histolojisi ise PV'ye benzemektedir. Az bir kısmında da antikor saptanmaz ve DİF'te boyanma gözlenmez (129).

DİF testinin pozitif prediktif değeri, yani testin pozitif olduğu kişilerin pemfigus olma olasılığı yaklaşık %100 iken negatif prediktif değeri, yani testin negatif olduğu kişilerin pemfigus olmama olasılığı ise %85-90'dır. Negatif prediktif değerin daha düşük olmasının nedeni ise inflame veya büllöz alanlardan alınan biyopsilere bağlı yalancı negatifliktir (129).

b) İndirekt İmmüfloresan Bulgular

İİF şüphelenen tanıyı doğrulamada yardımcı bir yöntemdir. IgG otoantikorları pemfiguslu olguların yaklaşık %80-90'ında pozitif olarak saptanır. Sensitivite kullanılan substrat ile ilişkilidir. Sırasıyla sensitivitesi en yüksek olanlar normal insan derisi, maymun özefagusu, sıçan özefagusudur (128). IgG PV, PF ve ilaca bağlı pemfigusta İSA depolanması gösterirken; PNP ve PE'de hem İSA hem

BMZ depolanması gösterir (130). IgA'nın İSA depolanması ise IgA pemfiguslu hastaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir (131). PNP için en ideal tarama testi sıçan mesanesi epitelidir. PNP tanısındaki sensitivitesi %75, spesifitesi ise %83'tür (132).

Pemfigus benzeri antikorlar yanık, penisiline bağlı ilaç erüpsiyonu, deri greftleri, büllöz pemfigoid, mukozal pemfigoid ve toksik epidermal nekroliz gibi durumlarda da görülebilmektedir. Bu yüzden bu gibi durumlarda yalancı pozitiflik görülebilir (128,129).

Tanısal değerinin yanı sıra İİF titresi direkt olarak hastalığın klinik şiddeti ile ilişkilidir ve hastalığın seyrini takip etme ve tedaviye yanıtı değerlendirmede kullanılabilir (133,134).

2.6.4 ELİSA

Dolaşımdaki otoantikorların spesifik olarak hangi antijene karşı geliştiklerinin saptanmasında kullanılır (135). ELİSA testleri ile saptanan spesifik otoantikorların titrasyonları hastalığın tanısının doğrulanmasında kullanılır. Ayrıca bu titrasyon değerleri hastalığın aktivitesindeki dalgalanmalar ile paralellik gösterir. Bu yüzden hastalığın aktivitesini takipte, buna göre tedaviyi planlamada ve klinik bir kanıt olmaksızın relapsları önceden tahmin etmede yararlıdır. (74,136,137). Diğer geleneksel tanı yöntemlerine göre ELİSA daha hızlı, uygulanması kolay, daha iyi standardize edilebilir olması ve birçok örneğin aynı anda çalışılabilmesi gibi avantajlara sahiptir.

ELISA'nın, PV tanısında dolaşımdaki otoantikorları saptamada en sensitif ve spesifik test olduğu düşünülmektedir (138,139). 82 PV ve 25 PF'li hastanın katıldığı bir çalışmada ELİSA'nın etkinliği İİF yöntemle karşılaştırılmış olup; ELİSA'nın sensitivitesi Dsg3'e karşı %95, Dsg1'e karşı %92 olarak saptanırken; İİF yöntemin sensitivitesi sırasıyla %79 ve %84 olarak saptanmıştır (138).

Sadece mukozal tutulum olan PV'de Dsg3 otoantikorları saptanırken, mukokutanöz tutulum olan kişilerde Dsg3 yanında Dsg1 otoantikorları da saptanır (140). PF ise tek başına Dsg1'e karşı gelişen otoantikorlar ile ilişkilidir (117). Deri lezyonlarının şiddeti anti-Dsg1 antikor düzeyi ile, oral mukoza lezyonlarının şiddeti anti-Dsg3 antikor düzeyi ile ilişkili bulunmuştur (141-143). Ancak kliniğimizde

pemfigus hasta grubunda yapılan bir çalışmada, klinik aktivite ile uyumlu olsa da ELISA sonuçlarının prediktif değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (141). İndirekt immunofloresan titrasyonları ile Dsg1 ve Dsg3'e karşı spesifik otoantikorların ELISA değerleri karşılaştırıldığında; İİF'nin titrelerinde artış olmasına karşın ELISA sonuçlarının belli bir değerden sonra aynı düzeyde kaldığı gözlenmiştir (144). Bu nedenle, takipte ELISA kullanılacaksa gerçek indeks değeri için, sonuç >150 IU/ml ise dilusyon yapılması önerilebilir (145).

2.6.5 İmmünoblotting ve İmmünopresipitasyon

Bu iki yöntem, pemfigustaki hedef antijenleri elektroforezle ayrıştırılmış belirli moleküler ağırlıktaki protein bantları olarak saptar. İmmünoblotting için protein substratların denatürasyonuna gerek vardır ancak immünopresipitasyon için buna ihtiyaç yoktur. Bu yüzden immünopresipitasyon üç boyutlu yapıya bağlı epitoplarla reaksiyona giren antikorların saptanmasında daha üstündür. Buna karşın immünoblotlar denatürasyondan sonra bile korunan epitoplarla reaksiyona giren antikorları saptarlar (74).

Pemfigus tanısında immünoblotting yöntem ile Dsg3'e karşılık gelen 130-kDa bandı hedef alan IgG tipi otoantikorlar gösterilmektedir. Deri tutulumu olan hastaların serumunda Dsg1'e karşılık gelen 160-kDa bandı hedef alan otoantikorlar da bulunmaktadır (130). PNP tanısında en sensitif yöntem olduğu yönünde yayınlar mevcuttur, karakteristik olarak çift bant 210-kD ve 190-kD proteinler gözlenir (146,147).

2.6.6 Elektron ve İmmünoelektron Mikroskopisi

Pemfigusta elektron mikroskopisinde, desmozomların sayısının azalmasına ve intersellüler aralığın artmasına bağlı olarak keratinositlerin birbirinden ayrılmasıyla karakterize akantoliz görülür. Desmozomdaki karşılıklı iki bağlantı plağında ayrılma olarak, tonofilamentlerin oluşturduğu tek bir plak gözlenebilir. Büyük bir bül oluşumundan sonra bile, bazal hücreler hemidesmozomlar ile lamina densaya bağlıdır ve bu mezar taşı görünümünü oluşturur (148).

İmmünoelektron mikroskopisi ilk olarak peroksidazın işaretleyici (marker) olarak kullanılması ile başlamıştır. Daha sonraları kolloidal altının işaretleyici

olarak kullanılması önemli bir ilerleme olarak kabul edilmiştir. Kolloidal altın ile yüksek çözünürlükler elde edilebilmekte ve antijenlerin kantitatif ölçümü yapılabilmektedir. İmmünoelektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda PV ve PF'de otoantikörlerin epidermisteki desmozomlara bağlandığı gösterilmiştir. Otoantikörlerin çoğu desmozomların ekstraselüler kısmına bağlanmaktadır. PV'de altın partiküllerinin bağlandığı desmozomlar, alt epidermiste üst epidermise göre belirgin oranda daha yüksek olarak saptanmıştır (148).

2.6.7 İİF Mozaik Tabanlı Biyoçip

Son dönemlerde tanıda DİF ve ELİSA'dan daha ucuz, pratik ve hızlı yapılabilir bir test elde etmek amacıyla İİF mozaik tabanlı biyoçip yöntemi geliştirilmiştir. Pemfigus dahil otoimmün büllöz hastalıkların tanısında tarama testi olarak kullanılabilecek bir yöntem olarak gelecek vaat etmektedir. Bir biyoçip üzerinde birden fazla antijenik yapının bulunması sayesinde tek bir serum örneği ile ayırıcı tanı yapma olanağı sunmaktadır (149,150).

2.7 Ayırıcı Tanı

PV'de sadece mukozal lezyonları olan hastalarda klinik olarak tanıyı koymak, deride bül ve erozyonların eşlik ettiği hastalara oranla daha zordur. PV mukozal lezyonların ayırıcı tanıları içerisinde herpetik stomatit, aftöz stomatit, eritema multiforme veya Stevens-Johnson sendromu, liken planus, sistemik lupus eritematozus ve skatrisyel pemfigoid bulunur. PV'nin kutanöz lezyonlarındaki ayırıcı tanılarda ise pemfigusun diğer formları, büllöz pemfigoid, lineer IgA dermatozu, eritema multiforme, Hailey-Hailey hastalığı ve transiyen akantolitik dermatoz (Grover hastalığı) yer alır.

PF'nin ayırıcı tanısında ise pemfigusun diğer formları, büllöz impetigo, SPD, lineer IgA dermatozu, seboreik dermatit bulunur.

PNP'nin ayırıcı tanıları içerisinde PV, skatrisyel pemfigoid, liken planus, Graft-versus-host hastalığı, inatçı HSV ve diğer viral enfeksiyonlar yer alır. Kemoterapiye bağlı stomatit de ayırıcı tanıları içerisinde yer almakla birlikte, buna bağlı klinik durumun 7-14 gün içerisinde gerilemesi beklenir.

PE klinik olarak seboreik dermatit ve sistemik lupus eritematozusla karışabilmektedir.

PVeg'in lezyonları ise iyododerma, bromoderma, blastomikoz ve anogenital bölge tutulumunda kondiloma lata, kondiloma aküminata, granüloma inguinale ile ayırıcı tanıya girmektedir.

IgA pemfigusunun ayırıcı tanısında subkorneal püstüler dermatoz, püstüler psöriasis, PF, büllöz impetigo, dermatitis herpetiformis bulunur. SPD alt tipi ile klasik SPD'nin klinik ve histolojik özellikleri birbirinden ayırt edilemez. IgA pemfigusunu diğer hastalıklardan ayırmak için IgA antikor depolanmasının gösterilmesi gerekmektedir.

PH ise dermatitis herpetiformis, lineer IgA dermatozu ve büllöz pemfigoidden ayırt edilmelidir (60,74,151).

2.8 Tedavi

Pemfigus tedavi edilmediğinde lezyonlarda spontan iyileşme eğilimi gözlenmez, lezyonlar giderek genişler ve hastalık progresyon gösterir. Dolaşımda bulunan antikorların elimine edilebilmesi için pemfigus tipik olarak sistemik tedavi gerektiren bir hastalıktır. 1950'lerde kortikosteroidlerin (KS) kullanılmaya başlanmasına kadar pemfigus mortalitesi %90 civarında bildirilmekteydi. Günümüzde KS ilaçlarla beraber immünosupresif ilaçların kullanılmasıyla mortalite oranı %5-10 civarlarına gerilemiştir (152).

Tedavide amaç lezyonların iyileşmesi, nükslerin önlenmesi, uzun dönem immünsupresif ve KS tedavisinin yan etkilerinin önlenmesi ve hastaların yaşam kalitesini arttırmaktır. Hastalığın başvuru sırasındaki şiddeti, pemfigusun tipi ve hastanın genel durumu tedavi seçimini belirlemede rol oynar (152). Tedavi rejimi sıklıkla KS ve adjuvan tedavinin kombinasyonundan oluşmaktadır. Hastalığı kontrol altına alabiliyorsa tek başına kortikosteroid kullanımı yeterli olur. Adjuvan ilaçlar genellikle etkinliği artırmak ve steroid dozunu azaltmak, böylelikle daha az steroid yan etkisine maruz kalmak için kullanılırlar. Genellikle adjuvan ilaçların etkilerinin ortaya çıkma süresi KS'lere göre oldukça geç olduğundan, çok nadiren PV tedavisinde adjuvan tedaviler tek başlarına kullanılmaktadır (153).

2.8.1 İlk Basamak Tedavi

Pemfigusta ilk basamak tedavi sistemik KS'lerdir. Daha önceleri mevcut olan yüksek mortalite oranları KS tedavileri ile oldukça düşmüştür. Günümüzde hastalığa bağlı mortalitenin önemli bir nedeni uzun dönem kullanılan yüksek doz KS tedavilerinin komplikasyonlarına bağlı olmaktadır. Bunlarında içerisinde en önemlisi enfeksiyonlardır (154). Daha önceleri 120-180 mg/gün gibi yüksek doz KS tedavileri savunulurken (155), sonraları KS tedavisinin yan etkilerinin sık ve doz ilişkili olduğu (156,157) ayrıca hastalığa bağlı ölümlerin %77'sinin KS ilişkili olduğu saptanmıştır (157). Ratnam ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, vücudun %50'sinden fazla yüzey alanı tutulumu olan şiddetli pemfigus hastalarında, başlangıç tedavisi olarak düşük doz prednizolon (45-60 mg/gün) ve yüksek doz prednizolon (120-180 mg/gün) tedavileri karşılaştırılmış olup; remisyon elde etme ve takip eden 5 yıl içerisinde relaps oranlarında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (158).

Günümüzde sistemik KS tedavisi, prednizolon 0,5-1,5 mg/kg/gün şeklinde hastalığın aktivitesine göre başlanması önerilmektedir. PF genellikle PV'ye göre daha düşük dozlar ile kontrol altına alınabilir. Eğer iki hafta içinde hastalık kontrol altına alınamaz ise opsiyonel olarak prednizolon dozu 2 mg/kg/gün dozuna kadar çıkılabilir. KS'e bağlı artmış risk durumlarında, uzun (>4 ay) kullanıma bağlı komplikasyon gelişiminde veya minimal tedavi dozunun (10 mg/gün) altına düşülemediği durumlarda sistemik KS tedavisine immünsüpresif adjuvanlar eklenebilir. Fakat ek adjuvan tedavisi eklenmesinin, tek başına glukokortikosteroid kullanımına üstünlüğü hakkında az sayıda kanıt vardır (159).

Sistemik pulse KS tedavisinde metilprednizolon günlük olarak 250-1000 mg dozunda, 2-3 saat içinde, intravenöz infüzyon olarak, 1-5 gün boyunca uygulanır. Deksametazon ile 100-300 mg arasında değişen yüksek dozlarda da pulse KS tedavi protokolleri bildirilmiştir (160-163). Mention ve ark.'larının yaptığı kontrollü çalışmada tüm hastalara 80 mg/gün prednizolon ve azatiyoprin (AZT) tedavisi verilmiş sonrasında ise hastalar randomize olarak aylık oral pulse deksametazon (300 mg) veya plasebo almışlardır. Remisyona kadar geçen süre, remisyon süresi ve kümülatif prednizolon dozu iki grupta aynı bulunmuştur. Yan etkiler deksametazon pulse tedavisi alan grupta daha fazla tespit edilmiştir (162).

Sistemik pulse KS tedavisinin, konvansiyonel birinci basamak tedavisi olan oral prednizolon ve immünsüpresif adjuvanlara karşı ek bir yararı yok gibi gözükmemektedir. Yine de bunun için daha çok kanıt gerekmemekte ve steroid pulse tedavisi dirençli pemfigus hastaları için saklanmalıdır (162,164).

KS tedavisi sonrası ortalama 2 haftada yeni lezyon çıkışı durur ve ortalama 1-3 ay içerisinde tam iyileşme gerçekleşir. KS'lerin düşüş şeması klinik yanıtla göre planlanmalıdır. Fiks kortikosteroid düşüş şemaları hastalıkta farklı remisyon paternleri olduğu için çok fazla kabul görmemektedir (165). Herbst ve Bystry, 40 PV hastasında remisyon paternlerini değerlendirmişlerdir. Hızlı cevap verenler, yavaş cevap verenler, persistan-intermittanlar ve dirençli hastalar olmak üzere 4 tip iyileşme paterni tanımlamışlardır. Bu yüzden hızlı yanıt verenlerle dirençli hastalara aynı düşüş şemasını uygulamak uygun olmamaktadır (166).

2.8.2 İmmünsüpresif Adjuvanlar

Günümüzdeki kanıtlara göre immünsüpresif adjuvanların sadece steroid azaltıcı etkileri bulunmakta ve steroidsiz remisyona katkıda bulunabilmektedirler. (161,167-171).

İlk basamak adjuvan tedaviler arasında AZT ve mikofenolat mofetil (MMF) vardır.

AZT pemfigusta adjuvan tedavi olarak en sık reçete edilen ilaçtır. Etkisi en az altı hafta süren latent bir period sonrasında ortaya çıkar (172-175). AZT 1-3 mg/kg/gün şeklinde verilebilir. İlk hafta 50 mg/gün başlanarak herhangi bir reaksiyona yol açmadığı gözlemlendikten sonra ihtiyaç duyulan doza yükseltilebilir (159).

AZT, tiyopürin metil transferaz (TPMT) enzimi tarafından inaktive edilmektedir. Toplumun %11'i düşük enzim seviyesine sahiptir ve miyelosupresyona yatkındır. En önemlisi 300 kişiden birisinde enzim tespit edilemeyecek kadar düşüktür, bu kişilerde çok hızlı gelişen, uzun süren ve hayatı tehdit eden pansitopeni gelişebilir. Bu yüzden tedaviye başlanmadan önce TPMT aktivitesi bakılarak, AZT kullanım dozu enzim seviyesine göre karar verilebilir (176). TPMT aktivitesi yüksek olan pemfigus hastaları normal dozda tedavi alabilirken, orta ve düşük TPMT aktivitesi olan hastalar 0,5-1,5 mg/kg/gün gibi

daha düşük dozda azatiyopürin tedavisi almalıdır. TPMT aktivitesi tespit edilemeyecek kadar düşük olanlar ise bu tedaviyi almamalıdır (159). AZT'nin başlıca kontrendikasyonları bilinen hipersensitivite, gebelik-emzirme (süte metaboliti 6 merkaptopürin geçer) ve çok düşük TPMT düzeyidir. Toksisitesinde ilk karaciğer enzimleri yükselmektedir, kemik iliği süpresyonunda ilk trombosit sayısı düşmektedir (152). Diğer yan etkileri arasında, bulantı, kusma, diare gibi gastrointestinal yakınmalar; toksik hepatit, pankreatit, deri döküntüleri, alopesi, hipersensitivite sendromu, ateş, fırsatçı enfeksiyonlar, onkojenite ve polinöropati sayılabilir (177). Bu durumlarda toksisite şiddetine göre doz azaltılmalı veya ilaç kesilmelidir

Chaidemenos ve ark.'larının oral PV'li hastalarda yaptıkları retrospektif analizde yüksek doz (1,5 mg/kg/gün) prednizon kullanan hastalar ile, güneşırı düşük doz 40 mg prednizolon ve her gün 100 mg AZT kullanan hastalar karşılaştırılmış ve her iki tedavi şeması da etkili bulunmuştur. Ancak hızlı ve ilerleyici pemfigus lezyonu olan hastalarda, hastalığı erken kontrol altına almak için yüksek doz prednizolonun önemli olduğunu göstermişlerdir (178).

MMF, AZT gibi bir pürin metabolizma antagonistidir. AZT'ye göre yan etkileri daha azdır. Erişkin pemfigus hastalarında 2 gr/gün veya mikofenolik asit 1440 mg/gün şeklinde tedavide kullanılabilir (159). Chams-Davatchi ve ark.'ları yaptıkları çalışmada tek başına oral prednizolon (2 mg/kg/gün) tedavisini aynı dozda prednizolona ek olarak azatiyoprin (2,5 mg/kg/gün), MMF (2 gr/day), ve intravenöz siklofosfamid pulse kombinasyonları ile karşılaştırmışlardır. Prednizolonun ortalama total dozu tek başına prednizolon kullanan grupta 11631 mg, AZT eklenen grupta 7712 mg, MMF eklenen grupta 9798 mg ve siklofosfamid eklenen grupta 8276 mg olarak tespit edilmiştir. Ortalama total doz tek başına prednizolon kullanan grupta 11631 mg, bir adjuvan kullanan gruplarda 8652 mg olarak tespit edilmiştir. Adjuvanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında AZT, MMF'ye anlamlı derecede üstün bulunmuş, AZT ile siklofosfamid ve siklofosfamid ile MMF grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada en başarılı adjuvan olarak AZT tespit edilmiştir (169). Yine farklı kontrollü çalışmalar ile de MMF'nin AZT'den daha az etkili olduğu gösterilmiştir (179). Bu bulgular göz önüne alındığında MMF, AZT-KS

kombinasyonuna cevap vermeyen olgularda alternatif bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir.

İkinci basamak adjuvan tedaviler içerisinde başlıca kullanılan ajanlar anti-CD20 monoklonal antikoru ritüksimab, yüksek doz intravenöz immünglobulin (İVİG), immünoadsorbsiyon, siklofosfamid, metotreksat (MTX), dapsondur (159).

Siklofosfamid, oral ve intravenöz kullanılabilen alkilleyici bir antineoplastik ve immünsüpresandır. Pemfigusta 500mg intravenöz bolus ya da oral olarak 2mg/kg/gün şeklinde kullanılabilir (180,181). Bu dozlarda da kemik iliği toksisitesi olabildiği için tam kan sayımı bakılması gereklidir. Pulse tedavi sayesinde kümülatif ilaç dozu ve bununla ilişkili sekonder malignansi riski azalır (182). Siklofosfamid, çocuk sahibi olmak isteyen genç hastalarda kullanılmamalıdır. Tedavi sırasında inovulasyon-amenore ve azospermi gelişebilmekte ve bazen kalıcı infertiliteye neden olabilmektedir. Hamilelik kesinlikle kontrendikedir ve emzirme de yapılmamalıdır. Bunların yanı sıra gastrointestinal yakınmalar, hemorajik sistit, nefrotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite, fırsatçı infeksiyonlar, mukozal ülserler, alopesi ve interstisyel akciğer fibrozisi gibi yan etkileri mevcuttur (183,184). Uzun süre siklofosfamid kullanımı ile mesane kanseri ve akut lösemi gelişme riskinde artış bildirilmiştir (161).

Olszewska ve ark.'ları geniş hasta içerikli retrospektif çalışmalarında KS monoterapisi (100 mg/gün) ile adjuvan siklofosfamid 100 mg (1,1-1,5 mg/kg/gün), AZT 100 mg (1,1-1,5 mg/kg/gün) ve siklosporin (2,5-3 mg/kg/gün) etkinliklerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada ortalama klinik remisyona ulaşma süresi KS monoterapisinde $7,2 \pm 13,1$ ay, AZT grubunda $6,8 \pm 10,5$ ay, siklosporin grubunda $8,1 \pm 11,8$ ay ve siklofosfamid grubunda $4,9 \pm 6,9$ ay bulunmuştur. Ortalama immünolojik olarak remisyona ulaşma süreleri ise monoterapi, AZT, siklosporin ve siklofosfamid gruplarında sırasıyla 33 ± 27 ay, 28 ± 24 ay, 30 ± 21 ay ve 23 ± 17 ay olarak tesbit edilmiştir. Yine sırasıyla ilacın kesilmesinden sonra 5 yıl relaps gelişmeme oranları %55, %50, %43 ve %69 olarak tesbit edilmiştir. Güvenlik açısından gruplar arasında fark tespit edilmemiştir. Klinik remisyon sonrası relaps görülene kadar geçen ortalama süre monoterapi, AZT, siklosporin ve siklofosfamid

grubunda sırasıyla $10,50 \pm 6,86$, $16,40 \pm 17,36$, $12,44 \pm 6,48$ ve $21,16 \pm 20,13$ olarak saptanmıştır. Yazarlar siklofosfamidin pemfigusta en etkili adjuvan olduğu kanısına varmışlardır (185). Hindistan’da yapılan retrospektif çalışmalarda da deksametazon/siklofosfamid pulse tedavisinin tek başına KS’lere göre hem hastalığı kontrol etmede, hem de KS yan etkileri açısından daha avantajlı bulunmuştur (181,186,187). Ancak 2011 yılından daha önce yapılan kontrollü çalışmaların düzenlendiği metaanaliz çalışmasının sonucunda siklofosfamidin diğer adjuvanlara göre üstünlüğü gösterilememiştir (161).

MTX, bir folat antagonistidir ve dihidrofolat redüktazı inhibe ederek DNA, RNA ve protein sentezini durdurur. En çok görülen yan etkileri hepatotoksisite, nefrotoksisite, kemik iliğinin baskılanması, bulantı ve kusma, oral ve gastrointestinal ülserler, alopesi, deri döküntüleri, interstisyel pnömoni, geri dönüşümlü oligospermi olarak sıralanabilir. MTX pemfigus tedavisinde 1965-1971 yılları arasında çeşitli yayınlarda 125–420 mg/hf gibi yüksek kemoterapi dozlarında denenmiş fakat bu dozlarda yüksek mortalite, şiddetli toksisite ve mukozit gibi durumlar görülmüştür; bu yüzden de pemfigus tedavisinde 25-30 yıl kadar kullanımı terk edilmiştir. Gürçan ve ark.’ları 2009 yılında hazırladıkları derlemede, PV tedavisinde 6 çalışmada, KS ile birlikte 10-50 mg/hafta MTX kullanan toplam 116 hastanın 96’ında (%83) klinik iyileşme olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarda KS başlangıç dozu dışında doz düşüş şemaları ayrıntılı bildirilmediği için MTX’in KS azaltıcı etkisi değerlendirilememiştir (188). Günümüzde 10-20 mg/hf dozunda alternatif adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır (189).

Siklosporin, T lenfositlerde sinyal iletimini baskılayıp başta IL-2 olmak üzere bazı lenfokinlerin salınımını engeller. Hücrel immunitiyi belirgin olarak baskımlarken humoral immunitiyi de azaltır. Hepatik yetmezliği olanlarda doz ayarlaması yapılmalıdır. Renal fonksiyon bozukluğu, hipertansiyon, hiperlipidemi, tremor, hirsutizm ve gingival hiperplazi gibi yan etkileri bulunmaktadır (177). Pemfigusta sistemik tedavi olarak ve oral lezyonlarda topikal tedavi olarak kullanılmıştır (161). 29 PV, 4 PF hastasından oluşan 33 kişilik hasta grubu rastgele iki gruba ayrılarak bir gruba tek başına metilprednizolon, diğer gruba ise metilprednizolona ek olarak 5 mg/kg dozunda siklosporin tedavisi verilerek yapılan bir çalışmada; 2 grup arasında tedaviye yanıt

açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ve ek olarak siklosporin alan grupta yan etki oranı daha yüksek saptanmıştır (190).

İVİG tedavisi çeşitli otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır. Etkisini Fc reseptörleri, kompleman aktivasyonu, sitokin ağı, dendritik hücre modülasyonu, T ve B hücre aktivasyonu, diferansiyasyonu, fonksiyonlarını etkileyerek ve immunglobulin katabolizmasını arttırarak oluşturduğu bildirilmektedir (191). İnfüzyon 4-4,5 saatte yavaş yapılmalı ve infüzyon süresince vital bulgular monitorize edilmelidir. Tedavi siklusları genellikle 3-4 haftada bir yapılırsa da bazen şiddetli vakalarda 2 haftada bir de uygulanabilir. İVİG tedavisi öncesi rutinlere ek olarak serum immünoglobulin düzeyleri ve kriyoglobulin düzeyleri değerlendirilmelidir. Özellikle IgA eksikliği olan bireylerde anti IgA antikorları oluşabileceğinden anafilaksi riski yüksektir, kriyoglobulinemisi olan olgularda ise akut renal yetmezlik riski artar. Kardiyak problemi olan hastalar hipertansiyon ve sıvı yüklenmesine bağlı kalp yetmezliği açısından sıkı takip edilmelidir (152). Dolaşımdaki otoantikorları hızlı ve selektif bir şekilde düşürdüğü, gereksinim duyulan KS dozunu düşürücü etkilerinin olduğu ve remisyon sürelerini uzattığı bildirilmiştir. Çalışmalarda tedaviden 1 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde pemfigus otoantikorlarının seviyelerinde %30-70 oranında azalma tespit edilmiştir. Buna karşın İVİG'in etkisi kısa süreli olmakta ve düşük otoantikor seviyelerini uzun süre devam ettirememektedir. Bu yüzden monoterapi olarak kullanılamamaktadır ve KS'ler ile birlikte adjuvan olarak kullanılmaktadır (192,193). İVİG ile ilgili ilk randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışma 2009 yılında yapılmış olup çalışmaya 61 hasta katılmıştır. Üç gruba 400 mg/kg/gün, 200 mg/kg/gün, 0 mg/kg/gün dozlarında ardışık 5 gün uygulanmış ve verilen dozla paralel etkinlik tespit edilmiştir. 400 mg/kg/gün dozunda tedavi alan grupta diğer gruplara göre hem klinik hem de anti-Dsg antikorlarında anlamlı derecede iyileşme tespit edilmiştir. Yine aynı grupta tedavi protokolünden çıkma süresi de plasebo grubuna göre anlamlı derecede kısalmıştır, bu da kümülatif KS dozunu azaltıcı etkisinin bir göstergesidir (191). Gebe hastalarda daha çok KS tedavisi monoterapi olarak uygulanmakla beraber, 2010 yılında yayınlanan bir olgu serisinde 8 gebe hastada, toplam 12 gebelikte İVİG kullanılmış; başarılı ve güvenilir olduğu bildirilmiştir (194). Uzun etkili olmaması ve maliyetinin pahalı

olması dezavantajları olsa da KS tedavisine yanıt vermeyen, immünsüpresyon istenmeyen hastalarda, ileri yaş, gebelik, hayatı tehdit edecek progresif hastalık durumunda tercih edilebilecek bir tedavi yöntemidir.

İmmünadsorbsiyon dirençli pemfigus olgularında özellikle KS ile AZT ya da MMF kombinasyonlarına yanıt vermeyen olgularda kullanılan diğer bir tedavi yöntemidir. İmmünadsorbsiyonun en etkili kullanım şekli sistemik immünsüpresif ajanlarla kombine olarak kullanımıdır (195-197). Plazmaferez yöntemi de pemfigusta tedavi yöntemleri arasında yer alsa da; plazmaferez plazma proteinlerini nonspesifik olarak temizlerken, immünadsorbsiyon dolaşımdaki immünglobulinleri ve immün kompleksleri daha spesifik olarak temizler. Genel olarak klinik iyileşme immünadsorbsiyon tedavisinden hemen sonra olmaktadır. Bazı olgularda etki kısa süreli olabilmektedir (117). Günde bir kez, dört ardışık günde yapılan uygulama bir tedavi siklusu kabul edilir ve sikluslar ayda bir tekrar edilmektedir. Eming ve ark.'ları pemfigusta yaptıkları çalışmada bir siklus sonrası anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 IgG'lerde %50-70 oranında azalma bildirmişlerdir. Tedavi sonrası ise anti-Dsg otoantikörlerinde hızlı bir şekilde yükselme saptanmıştır (198). Şiddetli sistemik enfeksiyonlarda, şiddetli kardiyovasküler hastalıklarda, immünadsorbsiyon komponentlerine karşı hipersensitivite durumunda, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ile tedavi alan kişilerde ve şiddetli hemorajik diyatezi olanlarda kullanımı kontrendikedir (159).

Dapson, çeşitli pemfigus vakalarında yararlı bir adjuvan tedavi yöntemi olarak bildirilmiştir (199-201). 2008 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 19 PV hastasının katıldığı çok merkezli bir çalışmada adjuvan olarak dapson (50 mg/gün) ve tek başına prednizolon alan iki grup karşılaştırılmış ve 1 yıllık takip süresi olan çalışmada dapson ile tek başına prednizolon alan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (202). Günümüzde 100 mg/gün ya da 1.5 mg/kg/gün'e kadar olan dozlarda kullanılabilmektedir (159).

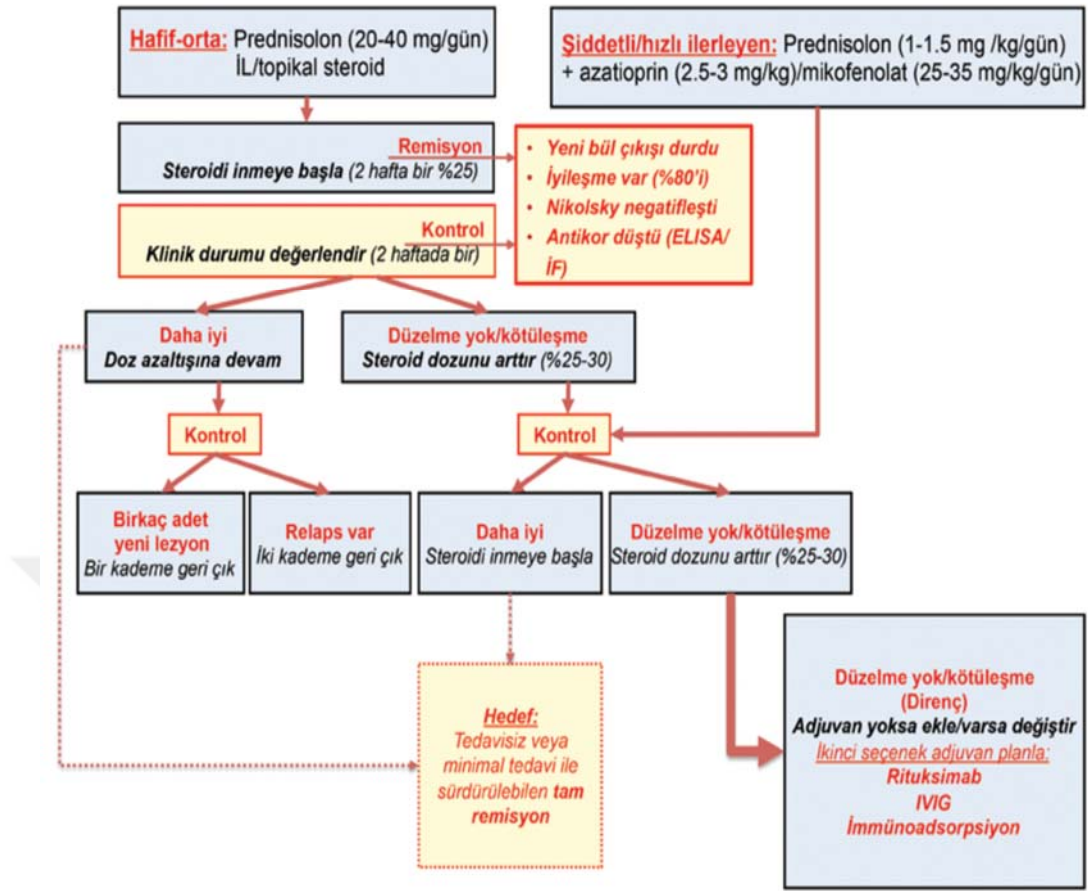
Ritüksimab selektif olarak pre-B ve olgun B lenfositleri hedef alan şimerik yapıda bir monoklonal IgG1 anti-CD20 antikörüdür. B hücrelerinin antikör üreten plazma hücrelerine dönüşmesini engelleyerek otoantikör üretimini baskılar. Son yıllarda da özellikle dirençli PV tedavisinde giderek artan bir oranda kullanılmaktadır (203). Ritüksimab pemfigusta 2x1000 mg (2 hafta ara ile) veya

4x375 mg/m² (1'er hafta ara ile) dozlarında kullanılabilir. En az 6 ay sonrasında itibaren olmak üzere klinik relaps durumunda tekrarlayan dozlar kullanılabilir (159).

Mouquet ve ark.'ları yaptıkları çalışmada ritüksimab tedavisi sonrası 6-12 ay kadar B hücre tükenişi olduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak IgM seviyeleri de takip eden 2 yıl içinde progresif düşüş göstermiştir. Tedaviden 1 ve 2 yıl sonra hastaların sadece %10 ve %50'si eski periferik B hücre sayılarına geri ulaşabilmişlerdir (204). Kliniğimizde yapılan ritüksimab tedavisi alan 13 hastanın katıldığı bir çalışmada, 12 hastaya 15 gün ara ile toplam iki kez 1000 mg infüzyon şeklinde, bir hastaya ise 375mg/m² dozunda haftada bir infüzyon toplam 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda ritüksimab tedavisi sistemik KS ihtiyacını azaltmada etkili ve güvenilir bir ajan olarak görülmüştür (205). Sonuç olarak pemfigusta olgu serilerinde oldukça yüksek başarı sağlayan ritüksimab, KS ve 1. basamak immünosupresan ajanlara yanıtızlık, klasik tedavileri tolere edememe, çok şiddetli olup, klasik tedaviye yanıt verme şansı az olan hastalarda önerilmektedir (206).

Yukarıdaki adjuvanlara ek olarak küçük olgu serilerinde veya izole olgularda kullanılan uygulamalar arasında altın, tetrasiklin/nikotinamid, minosiklin, klorambusil, sistemik takrolimus ve ekstrakorporeal fotoferez bulunmaktadır (40,152).

Şekil 2.6'te kliniğimizde uygulanan tedavi algoritması verilmiştir.



Şekil 2.6. Pemfigus vulgaris tedavisinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakultesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı'nda kullanılan tedavi algoritması
(Prof Dr Soner Uzun'un izni alınarak konmuştur.)

2.8.3 Ek Destek Tedavi

Oral mukoza, dudak ve derideki izole ve inatçı lezyonlara intralezyonel KS enjeksiyonu (triamsinolon asetonid) yapılabilir. Orofaringeal PV'li hastalarda yapılan bir çalışmada sistemik tedaviye ek olarak hastaların bir kısmının oral lezyonlarına haftalık 20 mg/ml konsantrasyonda triamsinolon asetonid intralezyonel enjeksiyonu uygulanmıştır. İntralezyonel KS tedavisi uygulananlarda, uygulama yapılmayanlara göre tam klinik remisyon süresinin kısaldığı, total KS dozunun azaldığı, ağrı ve rahatsızlık semptomları üzerine dramatik derecede faydalı olduğu gösterilmiştir (207).

Lezyonlara direkt olarak potent KS'ler (klobetazol propiyonat) veya kalsinörin inhibitörleri topikal olarak uygulanabilir. Orofaringeal erozyonlara,

triamsinolon asetonid jel gibi topikal KS'lerin sistemik tedavi ile birlikte direkt olarak oral mukozaya uygulanması yararlı olabilir (208,209).

Klorheksidin gibi antiseptik içeren banyoların yapılması önerilmektedir. Eğer erode lezyonlar var ise az yapışan yara örtüleri veya lokal emolyenler ile kapatılabilir. Parasetamol, metamizol ve opioidler gibi analjezik ajanlar gerekli olabilir. Benzer olarak lokal anestezi etkili jeller mukozal alanlara uygulanabilir. Uygun ağız, diş bakımı yapılmalı ve düzenli olarak takip edilmelidir. Ağız tutulumunun şiddetine göre ve alınan KS tedavisine göre diyetisyen yardımıyla uygun besin alımı düzenlenmelidir (159,210).

Hastalar KS'lerin yan etkilerine karşı bilgilendirilmeli ve tüm hastalara diyet (tuzsuz, proteinden zengin, yağdan ve karbonhidrattan fakir) önerilmelidir. Bu hastalar sıvı-elektrolit dengesi, enfeksiyon, osteoporoz-osteonekroz, hiperglisemi, hipertansiyon, kilo alımı, nöropsikiyatrik problemler, katarakt/glokom açısından sıkı takip edilmelidir. Ek olarak mide koruyucu olarak proton pompa inhibitörleri ve antiasitler, osteoporoza karşı kalsiyum ve D vitamini kombinasyonu kullanmaları rutin olarak önerilmelidir. Osteoporoz takibi kemik dansitometresi ile yapılmalı, gerekirse bifosfonat tedavisi başlanmalıdır. Tedavi öncesi hastalar tüberküloz açısından değerlendirilmeli tüberküloz hikayesi olan ve deri tüberkülin testi 10 mm'den yüksek olanlara izoniazid önerilmelidir (152).

2.9 Klinik İzlem

Pemfigus hastaları uzun süreli standart tedavi sonrasında sıklıkla remisyona girerler. Standart tedavi ile remisyon sağlanamayan hastalarda yukarıda belirtilen adjuvan ajanlar tedaviye eklenebilir. Hastalığın klinik takibi ve remisyon tedavinin gidişatını belirlemede önem taşır. Remisyon kimi hastalarda tedaviyi kesecek şekilde tam ve uzun sürelidir. Pemfiguslu hastalarda remisyon paternleri ve relaps/alevlenme ile ilgili 2008 yılında bir uzlaş toplantısı yapılmıştır (211). Çizelge 2.5'te bu konsensusta yapılan tanımlamalar gösterilmektedir.

Çizelge 2.5. Pemfigus için hastalık aktivite durumu ve tedavi yanıtlarına ait tanımlamalar (211)

İlk Değerlendirmeye Ait Terimler	
Başlangıç	Hekim tarafından tedavinin başlatıldığı gün
Hastalık aktivitesinin kontrolü (hastalık kontrolü; konsolidasyon fazının başlangıcı)	Yeni lezyon çıkışlarının olmadığı ve mevcut lezyonların iyileşmeye başladığı zaman
Konsolidasyon fazının sonu *	En az 2 hafta süresince yeni lezyon çıkışlarının olmadığı ve lezyonların yaklaşık %80'inin iyileştiği zaman
Geç Değerlendirmeye Ait Terimler	
Tedavisiz tam remisyon **	Herhangi bir sistemik tedavi almyorken yeni veya eski herhangi bir lezyonun olmaması
Tedavi altında tam remisyon **	Hasta minimal tedavi altındayken yeni veya eski herhangi bir lezyonun olmaması
Diğer Tanımlamalar	
Minimal tedavi	En az 2 ay süresince prednizon ≤ 10 mg/gün (veya dengi) ve/veya minimal adjuvan tedavi
Minimal adjuvan tedavi	Tedavi başarısızlığına neden olabilecek dozun yarısı
Tedavisiz kısmi remisyon	Hasta en az 2 aydır hiçbir sistemik tedavi almyorken, tedavi olmaksızın 1 hafta içinde düzelen geçici yeni lezyonların varlığı
Minimal tedaviyle kısmi remisyon	Topikal steroidler de dahil olmak üzere hasta minimal tedavi almyorken 1 hafta içinde düzelen geçici yeni lezyonların varlığı
Relaps/alevlenme	Hastalık kontrolüne ulaşılmış bir hastada, ayda 3 veya daha fazla sayıda gelişen ve 1 hafta içinde spontan olarak iyileşmeyen yeni lezyonların oluşması veya mevcut lezyonların genişlemesi
Tedavi başarısızlığı	Tam doz sistemik tedavi ile hastalık kontrolünü sağlamada başarısız olunması

* Klinisyenlerin çoğunun KS dozunu düşmeye başladığı noktadır.

** En az 2 ay boyunca yeni ya da eski herhangi bir lezyonun olmaması gerekir.

PV, otoantikörlerin DİF ile epidermisde, İİF test ile serumda gösterilebilen otoimmün bir hastalık olduğundan, pozitif immunfloresan bulgular hastalığın immunolojik belirteçleridir ve prognostik öneme sahiptir (212). Serum antikor titreleri çoğu hastada hastalığın şiddeti ile orantılı bulunmuştur (213). Ancak yeterince sensitif olmadığından hastalığın şiddetini göstermede güvenilir bir kriter değildir ve tedaviyi yönlendirmede kullanılamaz (214). Hastalar aktif dönemde iken tedavide doz ayarlaması klinik yanıtı bakılarak yapılır. Fakat hastalar klinik remisyonda iken doz azaltma veya tedaviyi sonlandırma kararı oldukça zordur ve genellikle ampirik olarak verilir. Bu dönemde klinik kriterler kullanılamaz ve İİF inceleme de yetersizdir (212,215). DİF inceleme ise immunolojik aktiviteyi gösterir ve prognostik önem taşır. Bu yüzden hastaların takip ve tedavilerinin düzenlenmesinde yardımcı olur. Hastalık klinik remisyonda iken DİF bulguları pozitif veya negatif olabilir. Pozitif DİF bulguları yüksek relaps riskini işaret ederken, DİF sonuçlarının negatif olması immunolojik remisyondan göstergesidir (212,216).

2.10 Prognoz

KS kullanımından önce mortalitesi oldukça yüksek olan bu hastalıkta önceleri daha çok sıvı elektrolit kaybı ve infeksiyonlar nedeniyle hastalar kaybedilirken günümüzde ise KS yan etkilerine bağlı başta enfeksiyon olmak üzere, diabet, osteoporoza bağlı kırık komplikasyonları ve hipertansiyon başlıca mortalite ve morbidite nedenleridir (217).

Erken tanı, hastalığın başlangıçtan itibaren hafif-orta şiddette olması, tedaviye erkenden yanıt alınması, eşlik eden özellikle diyabet, hipertansiyon gibi bir hastalığın olmaması ve hastanın genç olması iyi prognostik faktörler olarak kabul edilirken hastanın yaşlı olması ve hastalığın kısa sürede progresyon gösteren mukokutanöz tip bir pemfigus vulgaris olması ise kötü prognoz göstergeleri arasındadır. Elbette en kötü prognoz tedaviye rağmen mortalitenin %90 olduğu paraneoplastik pemfigustadır (218).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımlanması

Çalışmamız için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27/02/2014 tarihinde etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları polikliniğine yeni başvuran ya da takipli olan; klinik, histopatolojik ve immünfloresan ve/veya ELISA yöntemleriyle PV tanısı olan toplam 20 hasta alınmıştır. Kontrol grubu olarak ise bilinen otoimmün bir hastalığı olmayan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları polikliniğine başvuran 20 kişi dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan gönüllü hasta ve kontrol grubundan aydınlatılmış onam alınmıştır.

Hastaların demografik verileri, klinik özellikleri, hastaların çalışmaya dahil edildiği dönemdeki "Pemphigus Disease Area Index" PDAI (Çizelge 3.1) değerleri hasta kayıt formlarına kaydedildi. Çalışmaya katılan gönüllü hasta ve kontrol gruplarından periferik venöz kan örnekleri alındı. Bu kan örneklerinden ELISA testi ile IL-21 düzeyi bakıldı. Akım sitometrisi yöntemi ile hücre yüzey antijenleri boyanarak Tfh hücre profili ve hücre içi boyama ile IL-6 ve IL-21 düzeyleri değerlendirildi. Son olarak Polymerase Chain Reaction (PCR) yöntemi ile BCL6 gen ekspresyonları değerlendirildi.

Çizelge 3.1. PDAI (Pemphigus Disease Area Index)

Lokalizasyon	Erozyon/ bül veya eritem		Postinflamatuvar hiperpigmentasyon veya gerileyen lezyonlarda eritem
	0 yok 1 1-3 lezyon, en az biri > 2 cm ve tümü < 6 cm 2 2-3 lezyon, en az 2'si > 2 cm ve < 6 cm 3 > 3 lezyon, < 6 cm 5 > 3 lezyon ve/veya en az biri > 6 cm 10 > 3 lezyon ve/veya en az 1 lezyon > 16 cm	Lezyon sayısı 3 ve daha az ise sayısı	0 yok 1 var
Kulaklar			
Burun			
Yüzün geri kalanı			
Boyun			
Göğüs			
Karın			
Sırt, kalça			
Kollar			
Eller			
Bacaklar			
Ayaklar			
Genital bölge			
Toplam deri	() /120		() /12

SAÇLI DERİ

Saçlı deri	Erozyon/ bül veya Eritem	Lezyon sayısı 3 ve daha az ise sayısı	Postinflamatuvar Hiperpeigmentasyon veya gerileyen lezyonlardaki eritem
	0 yok 1 1 kadranda 2 2 kadranda 3 3 kadranda 4 tüm saçlı deri 10 > 6 cm en az 1 lezyon		0 yok 1 var
Total saçlı deri	() /10		() /1

MUKOZA

Lokalizasyon	Erozyon veya bül	
	0 yok 1 1 lezyon 2 2-3 lezyon 5 >3 lezyon veya > 2 cm 2 lezyon 10 tüm alan	Lezyon sayısı 3 ve daha az ise sayısı
Gözler		
Burun		
Bukkal mukoza		
Sert damak		
Yumuşak damak		
Üst gingival		
Alt gingival		
Dil		
Dudak mukozası		
Arka farenks		
Anogenital		
Total mukoza	() / 120	

Total Aktivite Skoru :

Toplam Hasar Skoru:

3.2 ELISA Yöntemi

ELISA yönteminde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu gelişen renk ile ölçülmektedir. Duyarlı, özgün ve çabuk sonuç veren bir testtir. Serolojik tanıda kolay ve hızlı olmasından dolayı geniş bir uygulama alanı bulmuştur. ELISA yönteminde antijen, katı bir faza bağlanmaktadır. Katı faz olarak rigid polystyrene, polyvinyl ve polypropilene'den yapılmış tüpler ve mikropalakaların daha uygun olduğu belirtilmektedir. ELISA'da enzim olarak beta galaktozidaz, glukozoksidaz, peroksidaz ve alkalın fosfotaz kullanılmaktadır. Enzimlerin katabolik etkileri enzim substrasyon reaksiyonu esnasında immunolojik reaksiyonun hem hızlanmasını, hem özgüllüğünü sağlamaktadır. Enzim substrat reaksiyonu genellikle 30-60 dakika içinde tamamlanır. Reaksiyon NaOH veya H₂SO₄ ile durdurulabilir ve sonuçlar, kullanılan kojugatın özelliğine göre 400-600 nm de okunur.

Biz deneyimizde ölçebileceği en düşük düzey pg/mL olan e-bioscience marka human IL-21 ELISA kiti kullandık ve her örneği kitin içerisinde belirtildiği gibi çift sıra kullandık. Test prosedürü aşağıda belirtildiği gibidir.

Test prosedürü

- 1- Standart örneklerden kuyucuklara 100 µl eklendi.
- 2- Hasta serumlarından kuyucuklara 100 µl eklendi.
- 3- 2 saat oda ısısında inkübasyon yapıldı.
- 4- Kuyucuklar aspire edildi ve 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 5- 100 µl biotin + anti- IL-21 detection antikoru koyuldu ve oda ısısında 1 saat inkübasyon yapıldı.
- 6- Kuyucuklar aspire edildi ve 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 7- 100 µl streptavidin-HRP enzimi ilave edildi ve oda ısısında yarım saat inkübasyon yapıldı.
- 8- Kuyucuklar aspire edildi ve 7 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 9- 100 µl substrat solüsyonu eklendi ve 15 dakika oda ısısında bekletildi.
- 10- 50 µl enzimatik reaksiyonu durduran solüsyon eklendi. Sıvı rengi maviden sarıya dönmesi beklendi.
- 11- 450 nm'de 2 saat içinde UV spektrometrede okuma yapıldı.

3.3 Akım (Flow) Sitometri Yöntemi

3.3.1 Yüzey Antijen Boyaması:

Tfh lenfosit profilinin belirlenmesi için hücre yüzeyinde yer alan CD45, CD3, CD4, CXCR5, ICOS ve PD1 proteinlerinin miktarları incelendi. Periferik kan örnekleri, bu proteinlere özgül floresan işaretli monoklonal antikorlarla (BD Pharmingen-San Diego, CA) boyandı ve akım sitometri cihazında (BD FACS CANTO II) örnek başına 10.000 hücrenin floresan sinyalleri ölçüldü. FACS Diva[®] yazılımı ile lökositler içinde hücre büyüklüğü ve hücre içi granül yoğunluğu (FSC/SSC) özelliklerine göre lenfositler seçildi ve daha sonra lenfositler içinde CD3 ve CD4 pozitif saptanan T helper (Th) lenfositler gruplandı. Th lenfositler içinde CXCR5, ICOS ve PD1 proteinlerini taşıyan hücreler ayrıca incelendi ve hücre dağılımları hesaplandı (Şekil 3.1).

1- Antikor boyama setleri;

- a) İzotip kontroller
- b) CD45 (FITC), CD3 (PE-CY7), CD4 (APC CY7), CXCR5 (PERCP 5.5), ICOS (PE), PD1 (APC) antikorları
- c) CD45 (FITC), CD3 (PE-CY7), CD4 (APC CY7), CXCR5 (PERCP 5.5) antikorları (daha sonra IL-21 (PE) ve IL-6 (APC) ile hücre içi boyama yapılmak üzere)

aynı inkübasyon tüpü içine hazırlandı.

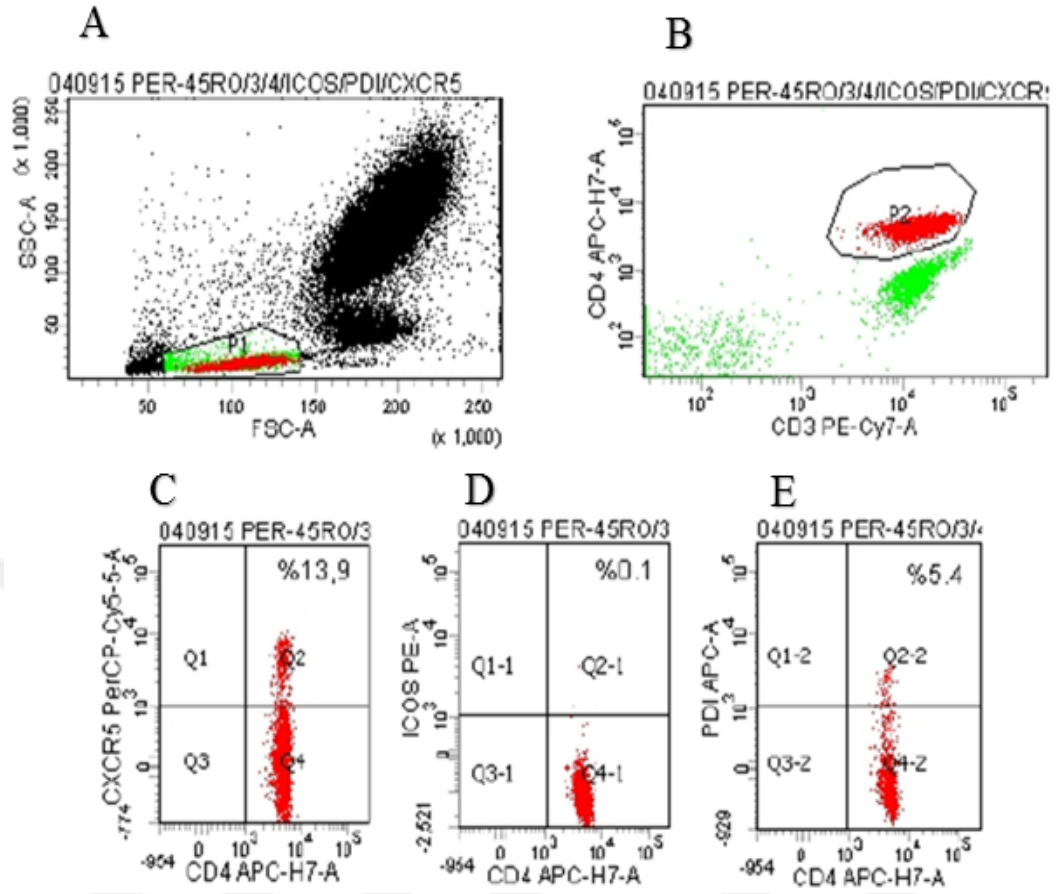
2- Antikor karışımı üzerine 100 µl periferik kan örneği eklendi hafif pipetaj yapıldı.

3- Oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

4- Inkübasyon süresi sonunda 2 mL FACS Lysing[®] solüsyonu eklenip karıştırıldı ve oda ısısında karanlıkta 8 dakika inkübe edildi.

5- FACS Asistan Wash[®] cihazında bağlanmayan antikorlar yıkandı.

6- Hücre yüzey proteinlerine bağlanan antikorlara ait floresan sinyaller akım sitometri cihazında ölçüldü.



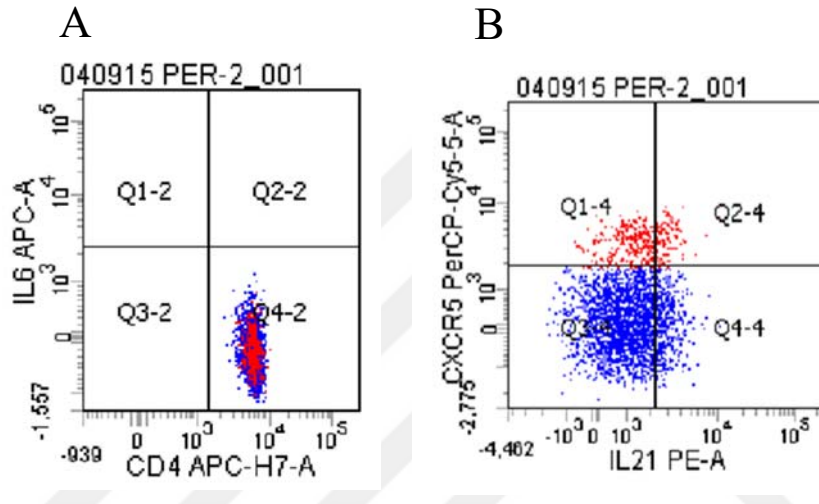
Şekil 3.1. Akım sitometri yöntemi ile Tfh hücrelerinin belirlenmesi:

Periferik kan örneklerindeki lökositlerin öncelikle hücre büyüklüğüne ve granüleritesine göre dağılımları incelendi ve lenfosit hücre grubu ayırt edildi (A). Seçilen lenfosit grubu hücreleri içinde CD3 ve CD4 pozitif olan hücreler saptandı (B). CD4+ T lenfositler içerisinde ise sırasıyla CXCR5+ (C), CXCR5+/ICOS+ (D), CXCR5+/PD1+ hücre yüzdeleri saptandı (E).

3.3.2 Hücre İçi Boyama

Tfh hücrelerindeki IL-21 ve IL-6 sitokin miktarlarının saptanması amacıyla bu sitokinler hücre içi direk floresan işaretli antikorlar kullanılarak incelendi. Hedef yüzey proteinleri için boyanmış olan hücreler, antikorların hücre içine girişi için membranda porlar açılarak uygun hale getirildi. Daha sonra ise IL-21 ve IL-6 sitokinleri antikorlar ile boyanıp incelendi (Şekil 3.2).

- 1- Hücre yüzey boyama işlemi biten tüplerin üzerine 1000 µl 1X “BD Perm Wash Buffer” eklenip karıştırıldı ve oda ısısında karanlıkta 8 dakika bekletildi.
- 2- Bu sürenin sonunda tüplere FACS Asistan Wash[®] cihazı ile yıkama işlemi yapıp IL-21 (PE) ve IL-6 (APC) antikorlarından daha önce denenmiş ve olumlu sonuç alınan miktarda antikor eklendi.
- 3- Oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 4- Bu sürenin sonunda hücreler akım sitometri cihazında okutuldu.



Şekil 3.2. Akım sitometri yöntemi ile hücre içi IL-6 ve IL-21’in belirlenmesi
 CD4⁺ T lenfositlerde hücre içi boyama sonrası IL-6 bulunduran hücre dağılımı (A),
 CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ T lenfositlerde hücre içi boyama sonrası IL-21 bulunduran
 hücre dağılımı (B)

3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

RNA eldesi: Plazması ayrılan periferik kan örneğinin hücre içeriği santrifüj edilerek çöktürüldü. Eritrositler, parçalama (lysis) tamponu solüsyonu kullanarak uzaklaştırıldı ve kalan çekirdekli hücrelerden silika kolon yöntemi ile total RNA eldesi gerçekleştirildi. RNA kalitesi ve miktarı spektrofotometrik olarak ölçüldü. RNA örnekleri cDNA sentezi için -80°C’de saklandı.

cDNA ve Kantitatif PCR: Periferik kan hücrelerinden elde edilen total RNA kalıbı kullanılarak random hexamer primerleri aracılığıyla cDNA sentezlendi. Hedef BCL6 geni mRNA ifadesi seviyesini belirlemek için bu gene özgü ekzon-

atlayan primerler tasarlandı. cDNA kalıbı ve primerler varlığında, SYBR Green içeren polimeraz enzimi kullanılarak kantitatif PCR (Rotorgene[®]) gerçekleştirildi. Beta Aktin geni referans olarak kullanıldı. Hedef (BCL6) ve referans (Beta Aktin) genlerine ait, siklus değerleri REST[®] programı kullanılarak normalize edildi.

3.5 İstatistiksel Yöntem

Veriler PASW 20 (SPSS/IBM, Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edildi. Örneklemi tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk varsayımı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Parametrik test varsayımlarının sağlandığı durumlarda bağımsız iki grup ortalamalarının farkı “Student t testi”, parametrik test varsayımlarının sağlanmadığı durumlarda ise bu testlerin parametrik olmayan alternatifleri, iki grup için “Mann-Whitney U” testleri kullanıldı. Ayrıca sürekli değişkenler arasındaki ilişki durumu da Pearson ve Spearman korelasyon katsayıları kullanılarak analiz edildi.

Analizlerde farklılıkların belirlenmesi için % 95 anlamlılık düzeyi (ya da $\alpha=0.05$ hata payı) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya 20 PV hastası ve otoimmün hastalığı olmayan 20 kontrol olgusu olmak üzere toplam 40 kişi dahil edildi.

PV hasta grubunda 7 erkek, 13 kadın olup; bu hastaların yaş ortalaması 52 ± 13 'tü. Çalışmaya dahil edilen kontrol grubunda ise 13 kadın 7 erkek bulunmaktaydı ve yaş ortalamaları 57 ± 13 olarak saptandı.

PV hastalarındaki ortalama hastalık süresi $4,63\pm4,41$ yıldır. Bu hastalardan 18 tanesi daha önce kliniğimizde takip edilmiş hastalar olup 2 tanesi yeni tanı PV hastasıydı. Takipli 18 hastadan 9 tanesi relaps, diğer 9 tanesi ise klinik olarak remisyondaydı.

Yapılan klinik muayene sonucunda hastaların ortalama PDAI değeri $6,25\pm10,07$ olarak saptandı. Bu hastalardan yeni tanı olan iki hastanın PDAI değeri 27 ve 28 olup, en yüksek değerler bu hastalara aitti. Remisyonadaki hastaların PDAI değeri sıfır olup; 9 remisyon hastası çıkarılıp sadece aktif PV hastalarının PDAI ortalamasına bakıldığında ise bu değer $11,36\pm11,35$ olduğu görüldü.

Hastaların ve kontrol grubunun demografik ve klinik verileri Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubunun demografik ve klinik bilgileri

Özellik	Pemfigus Vulgaris	Kontrol grubu
Cinsiyet Kadın Erkek	13 7	13 7
Yaş ortalaması	52 ± 13	57 ± 13
Klinik Yeni tanı Relaps Remisyon	2 9 9	-
Hastalık süresi ortalaması (yıl)	$4,63\pm4,41$	-
PDAI ortalaması	$6,25\pm10,07$	-

Pemfigus hastalarının ilaç kullanımına bakıldığında; 6 hasta hariç diğerlerinin sistemik tedavi aldığı saptandı. Sistemik tedavi almayan 6 hastadan; 3 tanesinin remisyonda olan, 2 tanesinin relaps gelişen ve 1 tanesinin de yeni tanı PV hastası olduğu görüldü. Sistemik tedavi alan 14 hastadan 6 tanesi remisyonda, 7 tanesi relaps gelişen, 1 tanesi de yeni tanı PV hastasıydı. Tedavi alan bu hastalar içerisinde 5 tanesi ritüksimab tedavisi almış olan hastalardı. Ritüksimab alan bu 5 hastadan 3'ü relaps, 2 tanesi ise remisyon halindeydi. Relaps ve remisyonadaki hastalardan 1'er tanesi ek olarak prednizolon tedavisi almaktaydı. Ritüksimab tedavisi almamış diğer sistemik tedavi alan tüm hastalar ise sadece sistemik prednizolon tedavisi almaktaydılar. PV hastalarının karakteristik özellikleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

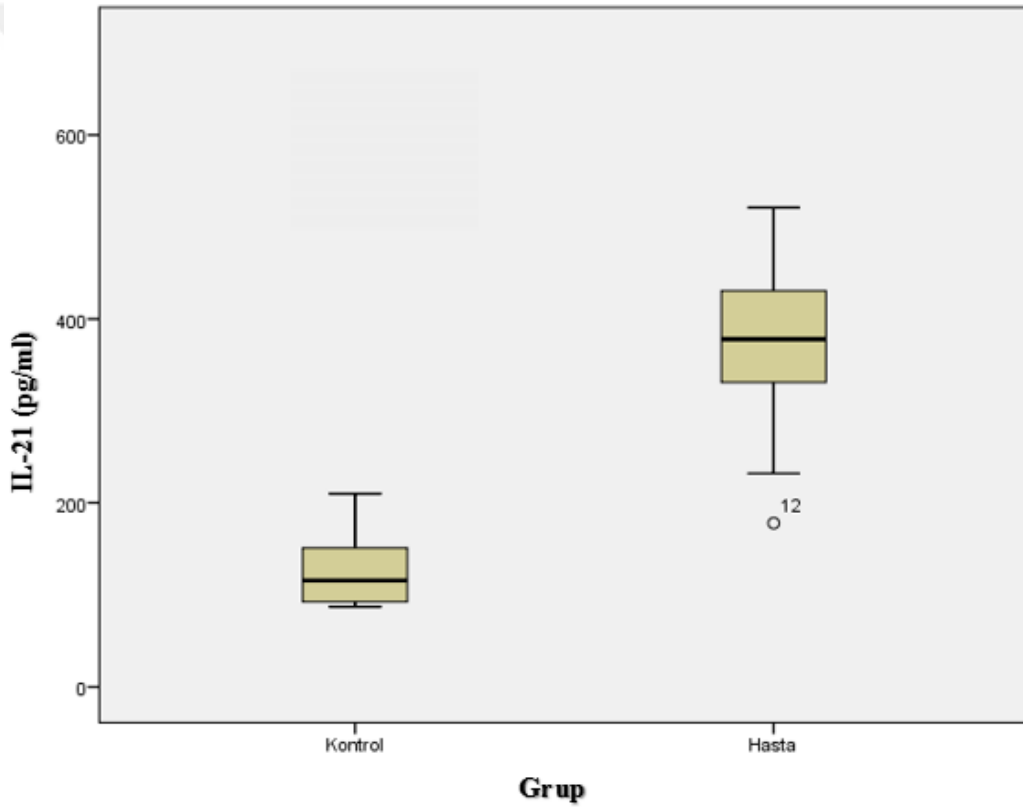
Çizelge 4.2. PV hastalarının karakteristikleri

Cinsiyet	Yaş	Hastalık süresi (yıl)	Tedavi	PDAI
K	35	1,5	-	0
K	47	8	8 mg/g pred	0
K	75	0,5	40 mg/g pred	27
K	53	1	8 mg/g pred	4
K	50	8	- *	1
K	40	19	- *	0
K	51	4	-	12
E	58	1	4 mg/2g pred	0
E	39	0,83	20 mg/g pred	0
K	56	0,33	-	28
K	47	5	-	0
K	37	1	24 mg/g pred	0
E	66	6	-	0
E	58	7	24 mg/g pred	2
K	79	1	16 mg/g pred	3
E	51	7	8 mg/g pred *	21
K	35	3	- *	1
E	72	8	-	24
E	46	5	8 mg/g pred *	0
K	40	5,5	8 mg/g pred	2

* Daha önce ritüksimab tedavisi almış olan hastalar
Pred: metilprednizolon

Hasta ve kontrol grupları demografik özellikler açısından karşılaştırıldığında; cinsiyet ve yaş açısından arada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık (sırasıyla $p=0,999$, $p=0,172$) saptanmamıştır.

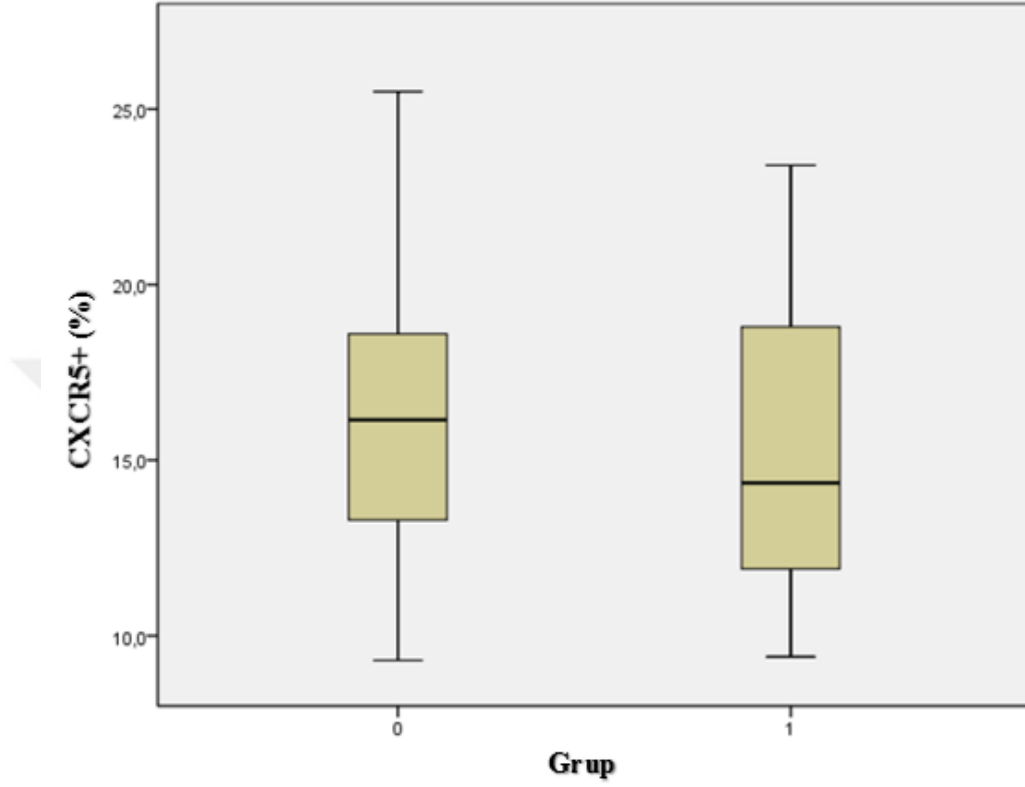
ELISA yöntemi ile kontrol ve hasta gruplarında plazmadaki IL-21 değerlerine bakıldığında hasta grubunda ortalama değer 383 ± 113 pg/ml, median değer ise 378 pg/ml olarak saptanmış olup; kontrol grubunda ortalama değer 145 ± 107 pg/ml, median değer ise 116 pg/ml olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak bakıldığında hasta grubunda kontrol grubuna göre plazmadaki IL-21 seviyesi anlamlı derecede yüksektir ($p<0.001$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Plazma IL-21 düzeylerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımı ($p<0.001$).

Hasta ve kontrol grubu arasında Tfh hücre profilleri karşılaştırmalı olarak bakıldığında $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ hücreler hasta grubunda $15,1 \pm 4$ ortalama değere ve $14,3$ median değere sahipken; kontrol grubunda aynı hücre grubunun

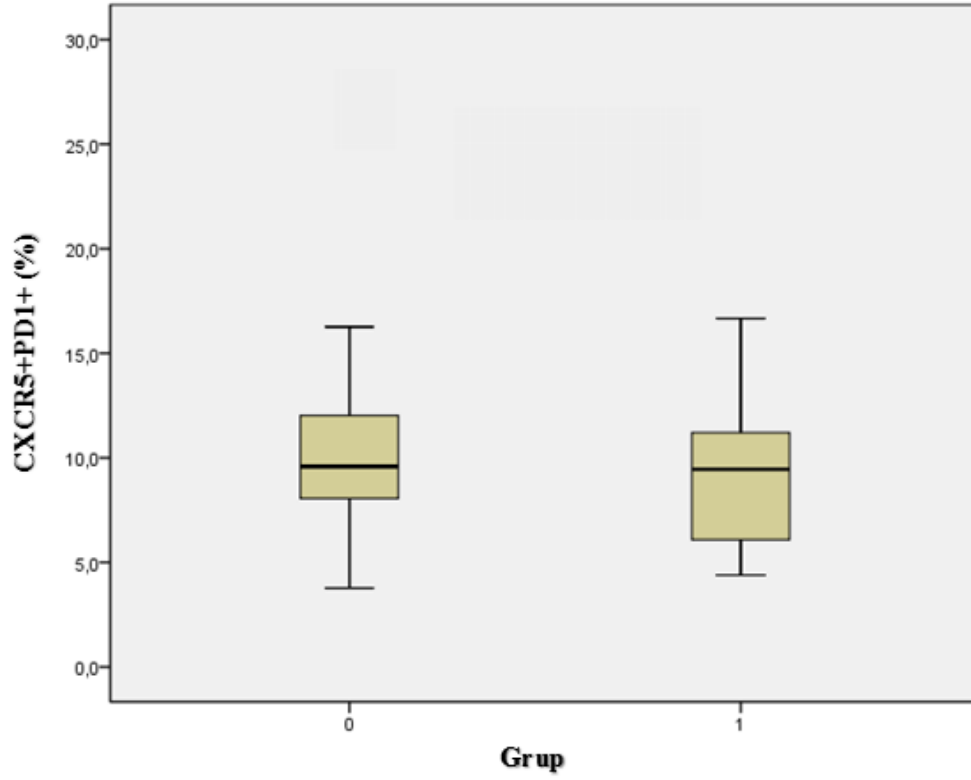
ortalama ve median değerleri sırasıyla %16,4±3,9 ve %14,3 olup her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p=0,236$) bulunamamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ Tfh hücrelerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımı ($p=0,236$)

0:kontrol, 1:hasta

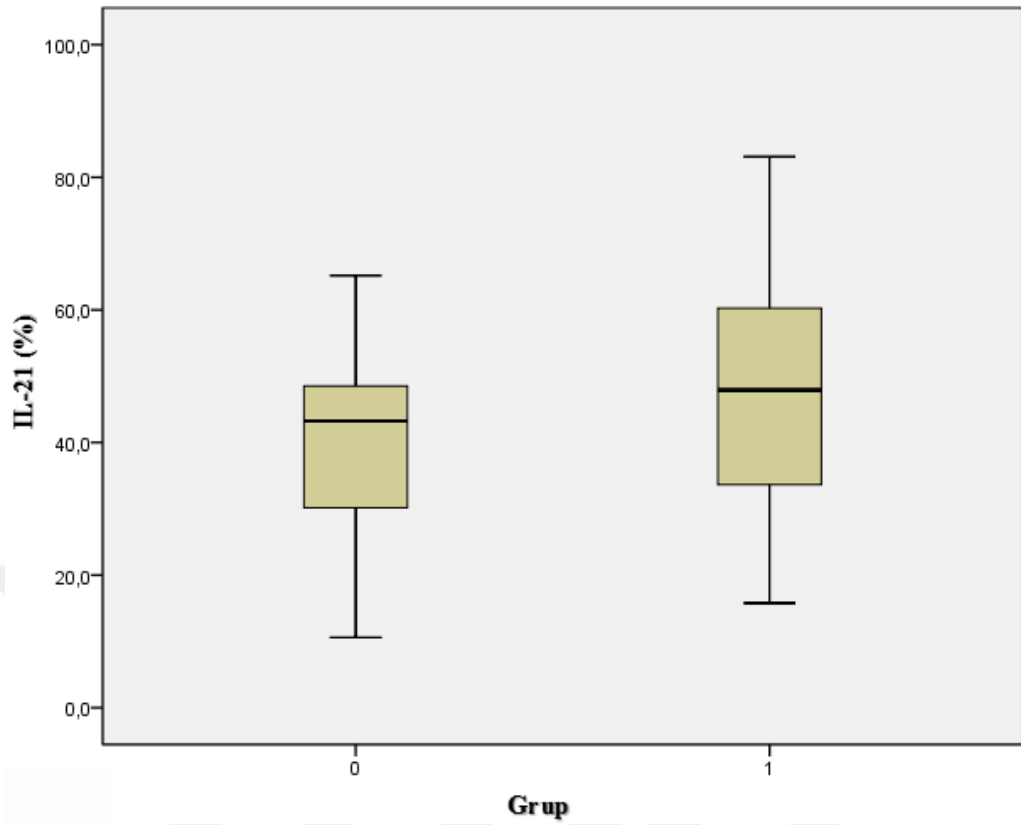
CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ Tfh hücreleri hasta grubunda ortalama olarak %9,2±3,7 ve median değer olarak %9,5 saptanırken; kontrol grubunda bu değerler sırasıyla %10,8±5,2 ve %9,6 olup her iki grup arasında istatistiksel olarak bakıldığında anlamlı bir farklılık ($p=0,447$) saptanmamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. CD3+CD4+CXCR5+PD1+ Tfh hücrelerinin kontrol ve hasta gruplarındaki dağılımı (p=0,447).

0:kontrol, 1:hasta

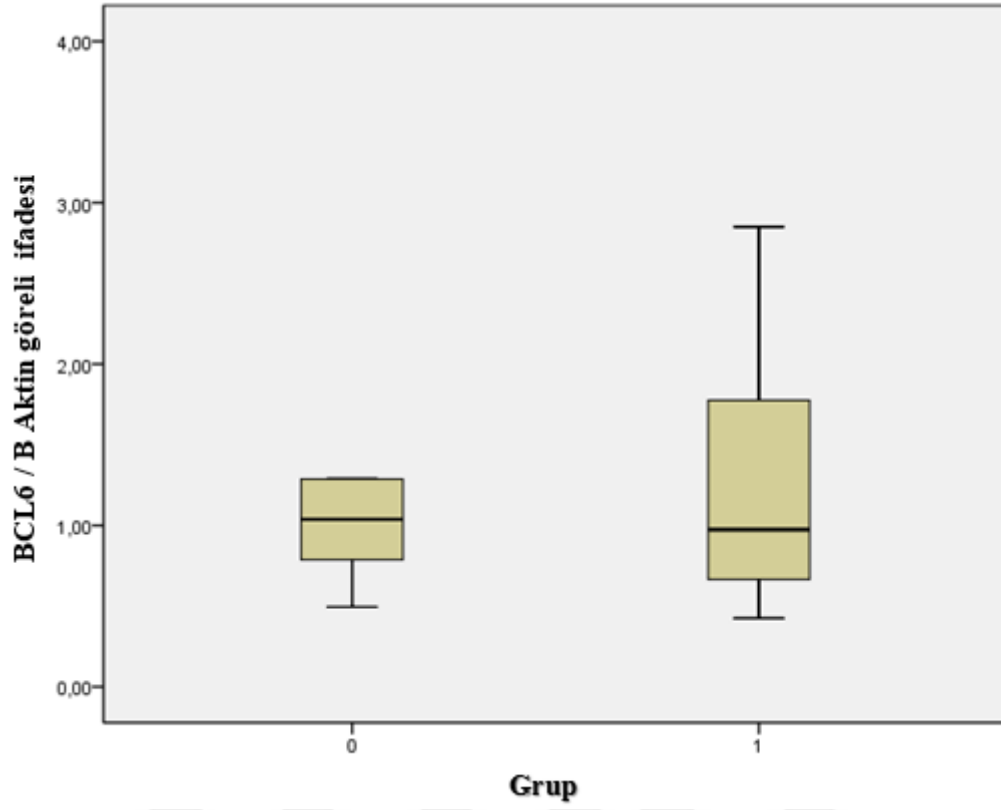
Hasta ve kontrol gruplarında CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ lenfositlerde hücre içi IL-21 düzeyleri karşılaştırıldığında; IL-21 hasta grubunda ortalama değer olarak hücrelerin %48±17,4'ünde ve median değer olarak %47,9'unda saptanırken; kontrol grubunda ise ortalama değer olarak hücrelerin %39,9±20,7'sinde ve median değer olarak %43,2'sinde saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda her iki grup arasında anlamlı fark (p=0,247) bulunamamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kontrol ve hasta gruplarının CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ lenfositlerde hücre içi IL-21 bulundurma oranları (p=0,247).

0:kontrol, 1:hasta

Hasta ve kontrol gruplarında BCL6 gen ifadesi için yapılan PCR çalışmasında; BCL6 genini ifade eden mRNA seviyesi hasta grubunda ortalama değer olarak $1,33 \pm 0,93$ saptanırken, median değer olarak 0,98 saptanmış olup; kontrol grubunda ise aynı değerler sırasıyla $1,22 \pm 0,64$ ve 1,04 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde iki grup arasında anlamlı farklılık ($p=0,890$) saptanmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kontrol ve hasta gruplarında BCL6 geni mRNA ifade seviyelerinin dağılımı (p=0,890).

0:kontrol, 1:hasta

Yukarıda bahsedilen hasta ve kontrol gruplarındaki $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ ve $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ hücre oranları, plazma IL-21 düzeyleri, $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ lenfositlerde hücre içi IL-21 bulundurma oranları, BCL6 geni mRNA ifade seviyelerinin dağılımı Çizelge 4.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. Pemfigus hastalarının ve kontrol grubunun laboratuvar bulguları

	Hasta Grubu		Kontrol Grubu		P
	Ortalama / SS*	Median	Ortalama / SS	Median	
IL-21 (ELISA)	383±113	378	145±107	116	<0,001
CXCR5⁺ (%)	15,1±4	14,3	16,4±3,9	16,1	0,236
CXCR5⁺PD1⁺ (%)	9,2±3,7	9,5	10,8±5,2	9,6	0,447
IL-21 (hücre içi) (%)	48±17,4	47,9	39,3±20,7	43,2	0,247
BCL6 mRNA	1,33±0,93	0,98	1,22±0,64	1,04	0,890

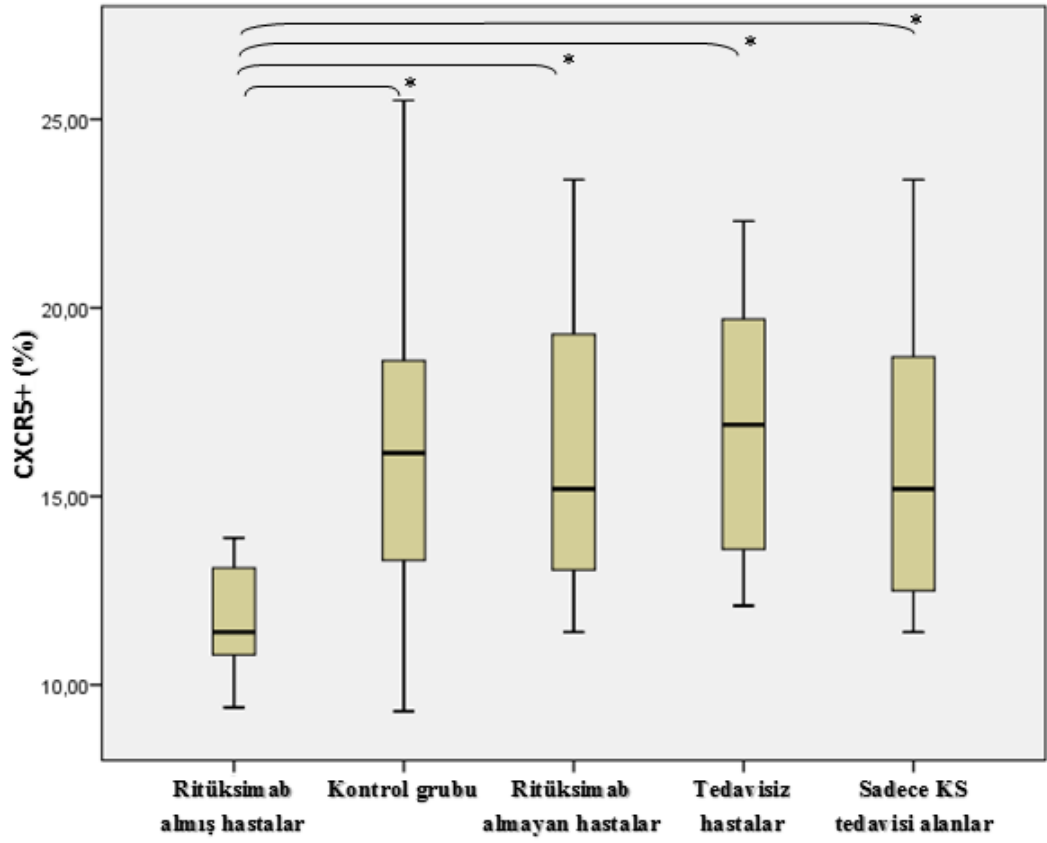
*Standart sapma

Hasta ve kontrol grupları arasındaki bu değerlendirmelerin ardından PV hasta grubunun içindeki tedavi almayan, sadece sistemik KS tedavisi alan ve ritüksimab tedavisi almış hastalar için ek değerlendirmeler yapıldı.

PV hasta grubu içerisinde tedavi alan hastalar ve tedavi almayan hastalar arasında CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ (p=0,187), CD3⁺CD4⁺CXCR5+PD1⁺ (p=0,536), plazma IL-21 (p=0,409), hücre içi IL-21 (p=0,621), mRNA (p=0,730) düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı.

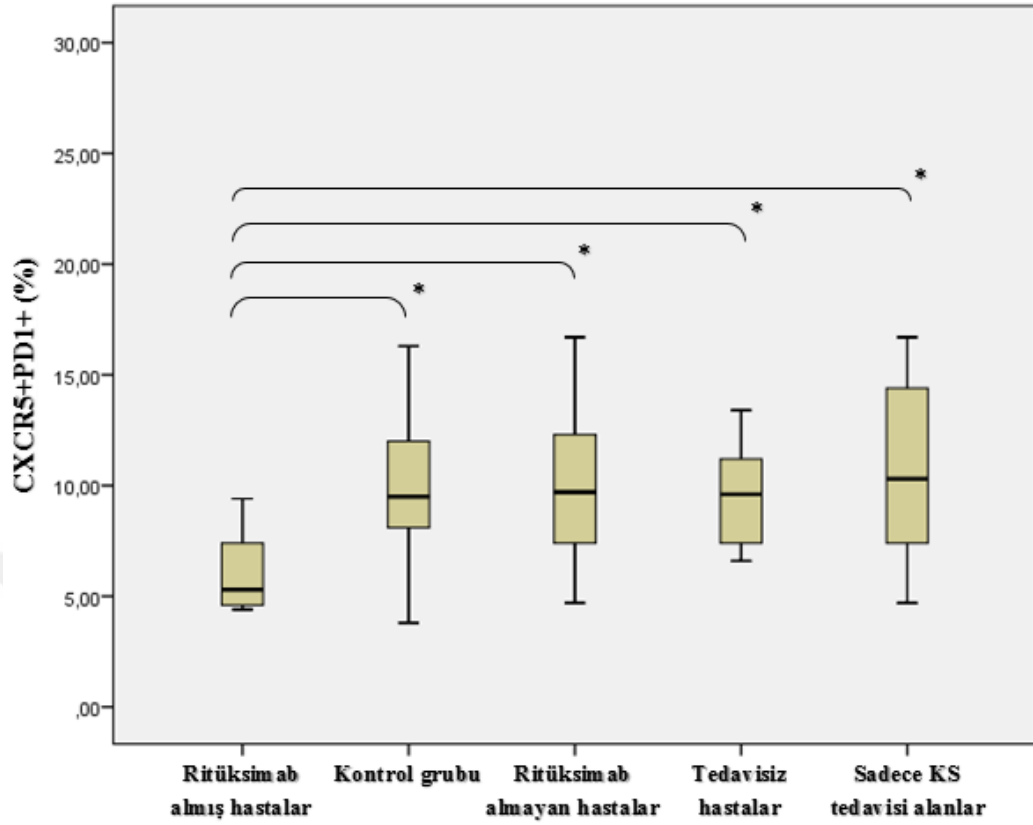
Sadece KS tedavisi alan PV hastaları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ (p=0,520), CD3⁺CD4⁺CXCR5+PD1⁺ (p=0,777), hücre içi IL-21 (p=0,138), mRNA (p=0,327) düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmazken; plazma IL-21 seviyelerinde PV hastalarında anlamlı yükseklik (p<0,001) saptandı.

Ritüksimab tedavisi almış olan hastalar ile kontrol grubu, ritüksimab tedavisi almayan diğer hastalar, sadece sistemik KS tedavisi alan hastalar ve tedavisiz hastalar arasında karşılaştırma yapıldı. Ritüksimab tedavisi alan hastalarda diğer gruplara göre CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ (sırasıyla p=0,014, p=0,014, p=0,033, p=0,028) (Şekil 4.6) ve CD3⁺CD4⁺CXCR5+PD1⁺ (sırasıyla p=0,044, p=0,018, 0,039, p=0,035) (Şekil 4.7) Tfh hücrelerinde anlamlı derecede düşüklük saptandı.



Şekil 4.6. CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ Tfh hücrelerinin hasta grubu içinde tedavi alımlarına göre ve kontrol grubunda dağılımı. Ritüksimab tedavisi alan hasta grubunda CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ Tfh hücreleri diğer gruplara göre anlamlı oranda düşük saptanmıştır.

* p<0,05



Şekil 4.7. $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ Tfh hücrelerinin hasta grubu içinde tedavi almalarına göre ve kontrol grubunda dağılımı. Ritüksimab tedavisi alan hasta grubunda $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ Tfh hücreleri diğer gruplara göre anlamlı oranda düşük saptanmıştır.

* $p<0,05$

Ek olarak hastalığı aktif durumda olan PV hastaları ile kontrol grubu arasında da bir karşılaştırma yapılmış olup; bu yapılan değerlendirmeye göre $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ ($p=0,312$), $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ ($p=0,753$), hücre içi IL-21 ($p=0,525$), mRNA ($p=0,497$) düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmazken; plazma IL-21 seviyelerinde aktif hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik saptandı ($p<0,001$).

5. TARTIŞMA

Günümüzde PV hastalığında otoreaktif T lenfositlerin rol oynadığına dair önemli kanıtlar mevcuttur (75). Tfh hücreleri ise yeni tanımlanan bir CD4 T yardımcı hücre alt tipi olup; B hücrelerine yardım etmektedirler. Tfh hücreleri germinal merkez formasyonu, afinite maturasyonu, yüksek afiniteli antikor gelişimi ve hafıza B hücrelerinin gelişimine yardımcı olarak humoral immünite için kritik rol oynamaktadır (81). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda Tfh hücrelerinin bazı otoimmün hastalıklarda periferik kanda artmış düzeyde olduğu saptanmıştır ve bu bulgular Tfh hücrelerinin otoimmün hastalıklardaki rolünü destekler niteliktedir (219). Bu çalışmada da PV hastalarında ve sağlıklı kontrollerde Tfh hücrelerinin periferik kandaki düzeyleri, Tfh hücrelerinin indüksiyonunda görev alan BCL6 gen ekspresyonu, BCL6 gen ekspresyonunu arttıran ve Tfh hücrelerinin regülasyonunda görev alan IL-21 ve IL-6 sitokinlerinin CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ lenfositlerdeki miktarları ve IL-21 plazma düzeyi incelenerek değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda hasta ve kontrol olgularından alınan periferik kan örneklerinde dolaşımdaki Tfh hücre grupları değerlendirildiğinde; CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ ve CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ lenfositlerin dağılımında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla p=0,239, p=0,460). Fakat literatürde Tfh hücrelerinin bazı otoimmün hastalıklarda yüksek oranda bulunduğuyla ilgili çalışmalar mevcuttur (8-10,85,88,220). Li ve ark. yaptıkları çalışmada büllöz pemfigoid hastaları ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerinde Tfh hücrelerini değerlendirmiş ve CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺ ve CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ hücrelerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (88). Yang ve ark. tarafından sistemik lupus eritematozuslu hastalarda yapılan bir çalışmada ise CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ Tfh hücreleri aktif hastalarda; inaktif hastalar ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı oranda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (221). Niu ve ark. 'nın yaptıkları çalışmada; psöriasis hastalarında kanda bulunan dolaşımdaki Tfh hücreleri değerlendirilmiş ve CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺, CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺, CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺PD1⁺ ve CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ hücrelerinin hepsi

psöriasis hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (85). “Pubmed” literatür taraması yaptığımızda Tfh hücrelerinin pemfigus hastaları üzerinde araştırıldığı tek benzer çalışmanın Hennerici ve ark. tarafından yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmada pemfigus hastalarında (n=10), myastenia gravis hastalarında (n=12) ve sağlıklı kontrollerde (n=12) Tfh hücreleri değerlendirilmiş olup; dolaşımdaki $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ hücreler pemfiguslu hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanırken, $CD3^+CD4^+CXCR5^+ICOS^+$ ve $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ hücrelerde gruplar arasında anlamlı bir fark bildirilmemiştir (10). Çalışmamızda Tfh hücreleri ile hasta ve kontrol grubu arasında ilişki saptanmazken yukarıda bahsedilen çalışmalarda görüldüğü gibi genel olarak hasta popülasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik saptanmıştır. Bu çalışmalardan Li ve ark. yaptığı çalışmada yeni tanı almış ve daha herhangi bir tedavi almamış büllöz pemfigoidli hastalar seçilirken, Niu ve ark.’nın yaptıkları çalışmada en az 1 aydır herhangi bir tedavi almamış psöriasis hastaları çalışmaya alınmıştır (85,88). Çalışmamızda Tfh hücre gruplarında anlamlı fark görülmemesinde rol oynayabilecek nedenlerden biri olarak hastalarımızın önemli bir kısmını remisyondaki ve hafif-orta şiddetteki pemfigus hastalarının oluşturması görülebilir. Ayrıca yine hastaların önemli bir kısmı immünsüpresif tedavi almakta olup bunun yol açabileceği terapötik etkiyi dışlayamayız. Bu görüşü destekler bir bilgi olarak Li ve ark.’nın büllöz pemfigoidli hasta grubu üzerindeki çalışması örnek gösterilebilir. Bu çalışmada tedavi öncesi dolaşımdaki $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ oranları tespit edilmiş olup sonrasında hastalara oral ya da intravenöz metilprednizolon tedavisi verilmiştir. Tedavi sonrasında $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ düzeyleri tekrar bakılıp; tedavi öncesi oranlarla karşılaştırıldığında bu hücre grubunda belirgin düşüş raporlanmıştır (88). Hennerici ve ark. tarafından pemfiguslu hastalarda yapılan çalışmada ise bizim çalışmamız ile benzer şekilde tedavi alan pemfigus hastalar çalışmaya dahil edilmiş olup daha önce de bahsedildiği gibi $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ hücrelerde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark görülse de $CD3^+CD4^+CXCR5^+ICOS^+$ ve $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ hücre grupları için iki grup arasında anlamlı bir fark bildirilmemiştir (10). Biz de çalışmamızda tedavinin Tfh hücrelerine etkisini değerlendirmek açısından PV hasta grubu

içerisinde Tfh hücre oranlarını tedavi alan hastalar (n=14) ve almayan hastalar (n=6) arasında karşılaştırdık ve iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Ritüksimab tedavisi alan hastaları, kontrol grubu ve ritüksimab tedavisi almayan diğer hastalar ile karşılaştırdığımızda ise $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ Tfh hücreleri ritüksimab alan hastalarda diğer iki gruba göre anlamlı derecede düşük (sırasıyla $p=0,014$, $p=0,014$) saptandı. Benzer şekilde $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ Tfh hücreleri karşılaştırıldığında da ritüksimab alan hastalarda bu hücre grubu diğer iki gruba göre anlamlı derecede düşük (sırasıyla $p=0,044$, $p=0,018$) bulundu. Bu sonuçlar da gösteriyor ki özellikle ritüksimab tedavisi alan hastalarda Tfh hücrelerinde belirgin düşüş görülmektedir. Xu ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada tip 1 diyabetli hastalarda ritüksimab tedavisi öncesi ve sonrası sirkülasyonda bulunan Tfh hücre oranları analiz edilmiş ve bizim çalışmamızla benzer şekilde tedavi sonrası Tfh hücrelerinde belirgin düşüş saptanmıştır (222).

IL-21, ana kaynağı Tfh hücreleri olan ve aynı zamanda Tfh hücrelerinin indüksiyonunda ve B hücrelerinin diferansiyasyonunda rol oynayarak B hücre proliferasyonunu ve antikor üretimini sağlayan bir sitokindir (223,224). Dolayısıyla çalışmamızda PV hastalarında Tfh hücrelerinin rolünü araştırmakta olduğumuz için hasta ve kontrol gruplarında plazma IL-21 düzeylerini inceledik. Tfh hücreleri için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark saptamazken; plazmadaki IL-21 düzeylerini değerlendirdiğimizde hasta popülasyonunda IL-21 düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu saptadık ($p<0.001$). Niu ve ark.'nın yaptığı çalışmada psöriasis hasta grubunda Tfh hücreleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptanırken plazma IL-21 düzeyleri de yine benzer şekilde hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (85). Yine Li ve ark.'nın büllöz pemfigoidli hastalarda yaptığı ve Hennerici ve ark.'nın pemfiguslu hastalarda yaptığı çalışmalarda da benzer şekilde hasta grubunda IL-21 seviyeleri anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Bizim sonuçlarımız da diğer çalışmalar ile uyumlu olup, bu bulgular IL-21'in otoimmün hastalıklarda rol oynadığını destekler niteliktedir. Fakat Tfh hücrelerini simgeleyen $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ hücrelerde benzer şekilde anlamlı yükseklik saptanmaması ve sadece IL-21 plazma düzeylerinde yükseklik saptanması öngörülerimizle ve diğer çalışmalar ile uyusmamaktadır (10,85). Bu durum, PV hastalarındaki IL-21

sentezindeki bu yüksekliğin Tfh hücreleri dışındaki başka hücrelerden de kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda ek olarak hasta ve kontrol gruplarında $CD3^+CD4^{++}CXCR5^+$ T lenfositlerde hücre içi IL-21 bulundurma oranlarına baktık. Hasta ve kontrol grubu arasında $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ Tfh hücreleri açısından anlamlı fark saptanmadığı gibi benzer şekilde $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ Tfh lenfositlerdeki hücre içi IL-21 bulundurma oranlarında da hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,257$). Bu bulgular da hasta grubundaki plazma IL-21 seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olmasının kaynağının Tfh hücreleri dışındaki hücrelerin olabileceğini desteklemektedir. Nitekim Th17 otoimmün hastalıklarda rol oynadığı düşünülen ve son zamanlarda pemfigus hastalığında rol oynayabileceğine dair çalışmaların da mevcut olduğu farklı bir CD4 T lenfosit alttipidir ve sentezlediği başlıca sitokinler arasında IL-17'nin yanı sıra IL-21 de mevcuttur (80,225).

IL-6, Tfh hücrelerinin diferansiyasyonunda görev alan bir sitokindir ve bu görevi IL-6 reseptörü aracılığı ile yeni aktive olmuş $CD4^+$ T lenfositlerde Tfh diferansiyasyonu için gerekli olan BCL6 geninin ekspresyonunu indükleyerek yerine getirir (81). Biz de çalışmamızda $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ T lenfositlerde hücre içinde IL-21 ile beraber IL-6 sitokinini de araştırdık. Fakat hasta ve kontrol gruplarında lenfositlerde hücre içinde IL-6 antikoruyla floresan sinyal saptayamadık.

BCL6, CD4 T lenfositlerden Tfh hücrelerinin gelişimi için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. Tfh hücrelerinde erken CXCR5 ekspresyonu için gereklidir (81). Hasta ve kontrol gruplarında yapılan PCR çalışmasında BCL6 genini ifade eden mRNA seviyeleri ölçüldü ve iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,905$). Daha önce PV hastalığında BCL6 ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Çalışmamızdaki PV hastalarında kontrol grubuna göre Tfh hücrelerinde anlamlı bir artış saptanmazken; Tfh hücrelerinin diferansiyasyonunda görev alan BCL6 geninin ekspresyonunu ifade eden mRNA seviyelerinde de anlamlı bir yükseklik olmaması öngörülebilir bir durumdur.

Sonuç olarak çalışmamızda Tfh hücrelerinde, bu hücrelerin sentezini indükleyen BCL6 genini ifade eden mRNA düzeyinde ve Tfh hücrelerindeki hücre içi IL-21 düzeylerinde PV hastalarında sağlıklı gönüllülere kıyasla anlamlı

bir farklılık saptanmamıştır. Sadece plazma IL-21 düzeylerinde PV hastalarında, sağlıklı gönüllülere göre anlamlı derecede yükseklik saptanmıştır. Ek olarak özellikle ritüksimab tedavisi alan hastalarda $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ ve $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ Tfh hücrelerinde belirgin düşüş saptanmıştır.

Çalışmamızda hasta sayısının azlığı, mevcut hastaların bazılarının remisyonda olması, aktif olanların ise çoğunluğunun immünsüpresif tedavi altında olması ve bu nedenle de hastaların çoğunda hastalığın hafif-orta şiddette seyretmesi; Tfh hücrelerinin hasta grubunda anlamlı derecede yüksek saptanmamasında rol oynamış olabilir. Otoimmün büllöz hastalıklarda Tfh hücrelerinin değerlendirildiği 2 adet çalışma yapılmış olup daha önce de bahsedildiği gibi bunlardan bir tanesi Li ve ark.'nın (88) yaptığı büllöz pemfigoid grubu hastalarda diğeri ise Hennerici ve ark.'nın (10) PF ve PV hastalarında yaptıkları çalışmadır. Bu iki çalışmada farklı sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla, Tfh hücrelerinin PV hastalığında tam olarak nasıl bir rol oynadıkları konusunda literatürdeki çalışmalar yeterli değildir; ancak ritüksimab tedavisi alan hastalarda Tfh hücre oranlarının kontrol grubundan belirgin şekilde daha düşük saptanması hastalığın patogenezinde rol oynayabileceğini desteklemektedir. Çalışmamızın sınırlılıkları arasında hasta sayısının az olması, tedavi alan, tedavisiz olan, aktif olan ve remisyonda olan hastaların bir arada olması olarak belirtilebilir. Tfh hücrelerinin PV hastalığı patogenezindeki yerinin daha iyi anlaşılabilmesi için immünsüpresif tedavi almayan aktif hastalar üzerinde ve daha geniş hasta gruplarında gerçekleştirilecek çalışmalar yapılmasına ve ek olarak olguların tedavi öncesi ve sonrası süreçlerde değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

SONUÇLAR

- 1- $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ ve $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ Tfh hücreleri dağılımında hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı.
- 2- Plazma IL-21 düzeyleri PV hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek saptandı.
- 3- $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ lenfositlerde hücre içi IL-21 oranlarında hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı.
- 4- BCL6 genini ifade eden mRNA düzeyleri için hasta ve kontrol grubu arasında fark saptanmadı.
- 5- Ritüksimab tedavisi alan hastalarda gerek kontrollere gerekse diğer hasta gruplarına göre $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ ve $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD1^+$ Tfh hücrelerinde belirgin azalma saptandı.

ÖZET

Pemfigus nadir görülen kronik seyirli otoimmün büllöz bir hastalıktır. Son yapılan çalışmalarda Tfh hücrelerinin, otoimmün hastalıklarda rol oynayabileceğine dair bulgular mevcuttur. Bu çalışmada, pemfigus vulgaris hastalarında Tfh hücreleri, BCL6 gen ekspresyonu, IL-21 ve IL-6 sitokinleri incelenerek Tfh hücrelerinin pemfigus vulgaris hastalığındaki rolünün anlaşılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları polikliniğine başvuran 20 adet pemfigus vulgaris hastası ve 20 adet herhangi bir otoimmün hastalığı bulunmayan kontrol olgusu dahil edildi. Çalışmaya alınan bireylerin her birinden periferik kan örneği alınarak akım sitometri yöntemi ile Tfh hücre dağılımı, $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ lenfositlerde hücre içi IL-21 ve IL-6 dağılımı, ELISA yöntemi ile plazma IL-21 düzeyi ve PCR yöntemi ile BCL6 genini ifade eden mRNA düzeyleri incelendi.

Hasta ve kontrol grubu arasında dolaşımdaki Tfh hücre oranları, $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ lenfositlerde hücre içi IL-21 ve BCL6 geninin ekspresyonunu ifade eden mRNA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı. Ritüksimab tedavisi alan hastalarda ise Tfh hücrelerinde diğer gruplara kıyasla belirgin oranda düşüş olduğu görüldü. Plazma IL-21 düzeyleri hasta grubunda belirgin oranda daha yüksek saptandı.

Sonuç olarak plazma IL-21 değerlerinin hasta grubunda yüksek saptanması ve ritüksimab alan hastalarda Tfh hücre oranlarının düşük olması; Tfh hücrelerinin pemfigus vulgaris patogenezinde rol oynayabileceğini destekleyen bulgular olsa da hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında Tfh hücre oranları açısından fark saptanmadı. Tfh hücrelerinin pemfigus vulgaris hastalığındaki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Pemfigus vulgaris, Tfh, IL-21, CXCR5, BCL6

ABSTRACT

Pemphigus is a rarely seen chronic autoimmune disease. Recent studies have findings that Tfh cells may play a role in autoimmune diseases. In this study Tfh cells, BCL6 gene expression, IL-21 and IL-6 cytokines were studied and aimed to understand the role of Tfh cells in pemphigus vulgaris disease.

20 pemphigus vulgaris patients and 20 healthy controls who have not any autoimmune diseases that admitted to Dermatology and Venereology Outpatient Clinic of Akdeniz University School of Medicine were included. Peripheral blood sample is taken from all individuals and studied to analyze Tfh cell distribution, IL-21 and IL-6 distribution in CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ lymphocytes with flow cytometry, plasma IL-21 levels with ELISA, mRNA levels that refers BCL6 expression with PCR.

Circulating Tfh cell distribution, IL-21 and IL-6 distribution in CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ lymphocytes and mRNA levels that refers BCL6 expression showed no difference between patient and healthy control groups. But in patients who had taken rituximab treatment there was a significant reduction at Tfh cells compared to other groups. Plasma IL-21 levels were significantly higher in patient group.

In result, although higher results of plasma IL-21 levels in patient group and Tfh cell reduction in patients who had taken rituximab treatment are findings that may support the role of Tfh cells in pathogenesis of pemphigus vulgaris; there were no significant difference in Tfh cell percentages between patient and healthy control group. Further studies are required to enlighten the role of Tfh cells in pemphigus vulgaris disease.

Key words: Pemphigus vulgaris, Tfh, IL-21, CXCR5, BCL6

KAYNAKLAR

1. Amagai M: Pemphigus. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology* New York: Mosby 2002:449–462.
2. Bystryń JC, Rudolph JL: Pemphigus. *Lancet* 2005, 366(9479):61-73.
3. Uzun S: Pemfigus. *Dermatoloji Ed Tüzün Y, Gürer MA, Serdaroğlu S, Oğuz O, Aksungur VL 3'üncü Baskı İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri* 2008:807-832.
4. Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz SI: Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 1998, 110(1):62-66.
5. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L et al: Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008, 29(1):138-149.
6. Nguyen VT, Ndoeye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA: Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest* 2000, 106(12):1467-1479.
7. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG: Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 2009, 30(3):324-335.
8. Ma J, Zhu C, Ma B, Tian J, Baidoo SE, Mao C et al: Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2012, 2012:827480.
9. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG et al: Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010, 62(1):234-244.

10. Hennerici T, Pollmann R, Schmidt T, Seipelt M, Tackenberg B, Mobs C et al: Increased Frequency of T Follicular Helper Cells and Elevated Interleukin-27 Plasma Levels in Patients with Pemphigus. *PloS one* 2016, 11(2):e0148919.
11. Lever WF: Pemphigus. *Medicine* 1953, 32(1):1-123.
12. Bystryn JC, Abel E, DeFeo C: Pemphigus foliaceus. Subcorneal intercellular antibodies of unique specificity. *Arch Dermatol* 1974, 110(6):857-861.
13. Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, Korman NJ, Jabs DA, Kory M et al: Paraneoplastic pemphigus. An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990, 323(25):1729-1735.
14. Brenner S, Bialy-Golan A, Anhalt GJ: Recognition of pemphigus antigens in drug-induced pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 1997, 36(6 Pt 1):919-923.
15. Hashimoto T: Recent advances in the study of the pathophysiology of pemphigus. *Arch Dermatol Res* 2003, 295 Suppl 1:S2-11.
16. Ioannides D, Hytioglou P, Phelps RG, Bystryn JC: Regional variation in the expression of pemphigus foliaceus, pemphigus erythematosus, and pemphigus vulgaris antigens in human skin. *J Invest Dermatol* 1991, 96(2):159-161.
17. Stanley JR: Pemphigus. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff KI et al, eds *Dermatology in General Medicine* McGraw-Hill, New York 1993:606–614.
18. Akman A: Pemfigusta Sınıflama. *Turkderm* 2008;42 Özel sayı 1 2008:5-7.
19. Kitajima Y: Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus. *Arch Dermatol Res* 2003, 295 Suppl 1:S17-23.
20. Alpsoy E, Akman-Karakas A, Uzun S: Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 2015, 307(4):291-298.
21. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA et al: Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(11):5056-5060.

22. Simon DG, Krutchkoff D, Kaslow RA, Zarbo R: Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972 to 1977. *Arch Dermatol* 1980, 116(9):1035-1037.
23. Uzun S, Durdu M, Akman A, Gunasti S, Uslular C, Memisoglu HR et al: Pemphigus in the Mediterranean region of Turkey: a study of 148 cases. *Int J Dermatol* 2006, 45(5):523-528.
24. Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, Hans-Filho G, Aoki V et al: The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *N Engl J Med* 2000, 343(1):23-30.
25. Meyer N, Misery L: Geoepidemiologic considerations of auto-immune pemphigus. *Autoimmun Rev* 2010, 9(5):A379-382.
26. Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A et al: Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. *J Am Acad Dermatol* 1997, 36(1):44-52.
27. Krain LS, Terasaki PI, Newcomer VD, Mickey MR: Increased frequency of HL-A10 in pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1973, 108(6):803-805.
28. Alpsoy E: Otoimmün Büllöz Hastalıkların Epidemiyolojisi. *Türkderm* 2011, 45(Özel Sayı 1):3-7.
29. Koc CK, Sallakci N, Akman-Karakas A, Alpsoy E, Yegin O: Human leukocyte antigens class I and class II in patients with pemphigus in southern Turkey. *Int J Dermatol* 2013, 52(1):53-58.
30. Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R: Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2013, 31(4):374-381.
31. Ljubojevic S, Lipozencic J: Autoimmune bullous diseases associations. *Clin Dermatol* 2012, 30(1):17-33.
32. Sehgal VN, Srivastava G: Paraneoplastic pemphigus/paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome. *Int J Dermatol* 2009, 48(2):162-169.

33. Ruocco E, Lo Schiavo A, Baroni A, Sangiuliano S, Puca RV, Brunetti G et al: Pemphigus vulgaris after coxsackievirus infection and cephalosporin treatment: a paraviral eruption? *Dermatology* 2008, 216(4):317-319.
34. Brandao ML, Fernandes NC, Batista DP, Santos N: Refractory pemphigus vulgaris associated with herpes infection: case report and review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011, 53(2):113-117.
35. Esmaili N, Mortazavi H, Noormohammadpour P, Boreiri M, Soori T, Vasheghani Farahani I, Mohit M: Pemphigus vulgaris and infections: a retrospective study on 155 patients. *Autoimmune Dis* 2013, 2013:834295.
36. Brenner S, Tur E, Shapiro J, Ruocco V, D'Avino M, Ruocco E et al: Pemphigus vulgaris: environmental factors. Occupational, behavioral, medical, and qualitative food frequency questionnaire. *Int J Dermatol* 2001, 40(9):562-569.
37. Robbins AC, Lazarova Z, Janson MM, Fairley JA: Pemphigus vulgaris presenting in a radiation portal. *J Am Acad Dermatol* 2007, 56(5 Suppl):S82-85.
38. Tan SR, McDermott MR, Castillo CJ, Sauder DN: Pemphigus vulgaris induced by electrical injury. *Cutis* 2006, 77(3):161-165.
39. Vignale R, Espasandin J, Cassinelli A, Casella de Vilaboa E, Gonzalez V: Pemphigus vulgaris after electrosurgery (thermal-heat therapy) of a basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 1993, 32(4):307-308.
40. Ruocco V, Ruocco E. Pemphigus and environmental factors. *G Ital Dermatol Venereol* 2003;138:299-309.
41. Voza A, Ruocco V, Brenner S, Wolf R: Contact pemphigus. *Int J Dermatol* 1996, 35(3):199-201.
42. Brenner S, Ruocco V, Wolf R, de Angelis E, Lombardi ML: Pemphigus and dietary factors. In vitro acantholysis by allyl compounds of the genus *Allium*. *Dermatology* 1995, 190(3):197-202.
43. Brenner S, Ruocco V, Ruocco E, Russo A, Tur E, Luongo V et al: In vitro tannin acantholysis. *Int J Dermatol* 2000, 39(10):738-742.

44. Feliciani C, Ruocco E, Zampetti A, Toto P, Amerio P, Tulli A et al: Tannic acid induces in vitro acantholysis of keratinocytes via IL-1alpha and TNF-alpha. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007, 20(2):289-299.
45. Misery L: Skin, immunity and the nervous system. *Br J Dermatol* 1997, 137(6):843-850.
46. Cremniter D, Baudin M, Roujeau JC, Prost C, Consoli SG, Frances C et al: Stressful life events as potential triggers of pemphigus. *Arch Dermatol* 1998, 134(11):1486-1487.
47. Morell-Dubois S, Carpentier O, Cottencin O, Queyrel V, Hachulla E, Hatron PY et al: Stressful life events and pemphigus. *Dermatology* 2008, 216(2):104-108.
48. Koch PJ, Franke WW: Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1994, 6(5):682-687.
49. Barnett ML: Effect of pemphigus antibodies on desmosomal structure in vitro. *J Invest Dermatol* 1978, 70(3):141-142.
50. Hashimoto K, Lever WF: An electron microscopic study on pemphigus vulgaris of the mouth and the skin with special reference to the intercellular cement. *J Invest Dermatol* 1967, 48(6):540-552.
51. Hu CH, Michel B, Schiltz JR: Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1978, 90(2):345-362.
52. Amagai M, Hashimoto T, Green KJ, Shimizu N, Nishikawa T: Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 1995, 104(6):895-901.
53. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA: Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982, 306(20):1189-1196.
54. Wasserstrum N, Laros RK, Jr.: Transplacental transmission of pemphigus. *JAMA* 1983, 249(11):1480-1482.
55. Aktan Ş: Otoimmün Büllöz Hastalıkların Etyopatogenezi. *Türkderm* 2011; 45:8-15 2011.

56. Nagel A, Lang A, Engel D, Podstawa E, Hunzelmann N, de Pita O, Borradori L, Uter W, Hertl M: Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2010, 134(3):320-330.
57. Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP: The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci* 2006, 119(Pt 5):797-806.
58. van der Wier G, Pas HH, Jonkman MF: Experimental human cell and tissue models of pemphigus. *Dermatol Res Pract* 2010, 2010:143871.
59. Hashimoto T, Amagai M, Garrod DR, Nishikawa T: Immunofluorescence and immunoblot studies on the reactivity of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera with desmoglein 3 and desmoglein 1. *Epithelial Cell Biol* 1995, 4(2):63-69.
60. Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS: The new pemphigus variants. *J Am Acad Dermatol* 1999, 40(5 Pt 1):649-671; quiz 672-643.
61. Porro AM, Caetano Lde V, Maehara Lde S, Enokihara MM: Non-classical forms of pemphigus: pemphigus herpetiformis, IgA pemphigus, paraneoplastic pemphigus and IgG/IgA pemphigus. *An Bras Dermatol* 2014, 89(1):96-106.
62. Ohata Y, Amagai M, Ishii K, Hashimoto T: Immunoreactivity against intracellular domains of desmogleins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 2001, 25(1):64-71.
63. Lanza A, Cirillo N, Femiano F, Gombos F: How does acantholysis occur in pemphigus vulgaris: a critical review. *J Cutan Pathol* 2006, 33(6):401-412.
64. Chaudhari P, Marinkovich MP: What's new in blistering disorders? *Curr Allergy Asthma Rep* 2007, 7(4):255-263.
65. Orlov MD, Chernyavsky AI, Arredondo J, Grando SA: Synergistic actions of pemphigus vulgaris IgG, Fas-ligand and tumor necrosis factor-alpha during induction of basal cell shrinkage and acantholysis. *Autoimmunity* 2006, 39(7):557-562.
66. Pan M, Liu X, Zheng J: The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 2011, 36(7):703-707.

67. Bystryn JC, Grando SA: A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: the basal cell shrinkage hypothesis. *J Am Acad Dermatol* 2006, 54(3):513-516.
68. Schmidt E, Waschke J: Apoptosis in pemphigus. *Autoimmun Rev* 2009, 8(7):533-537.
69. Frusic-Zlotkin M, Raichenberg D, Wang X, David M, Michel B, Milner Y: Apoptotic mechanism in pemphigus autoimmunoglobulins-induced acantholysis--possible involvement of the EGF receptor. *Autoimmunity* 2006, 39(7):563-575.
70. Heupel WM, Engerer P, Schmidt E, Waschke J: Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* 2009, 174(2):475-485.
71. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR: Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999, 103(4):461-468.
72. Amagai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T: The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 1999, 40(2 Pt 1):167-170.
73. Hanakawa Y, Matsuyoshi N, Stanley JR: Expression of desmoglein 1 compensates for genetic loss of desmoglein 3 in keratinocyte adhesion. *J Invest Dermatol* 2002, 119(1):27-31.
74. Amagai M: Vesiculobullous Diseases, Pemphigus. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. Spain Mosby Elsevier. 2008:417-429.
75. Hertl M, Eming R, Veldman C: T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 2006, 116(5):1159-1166.
76. Hertl M, Veldman C: T-cellular autoimmunity against desmogleins in pemphigus, an autoantibody-mediated bullous disorder of the skin. *Autoimmun Rev* 2003, 2(5):278-283.

77. Eming R, Budinger L, Riechers R, Christensen O, Bohlen H, Kalish R et al: Frequency analysis of autoreactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay. *Br J Dermatol* 2000, 143(6):1279-1282.
78. Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G et al: Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol* 2003, 170(1):635-642.
79. Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, Wassmuth R, Grotzinger J, Schultz E et al: T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals. *J Immunol* 2004, 172(6):3883-3892.
80. Arakawa M, Dainichi T, Yasumoto S, Hashimoto T: Lesional Th17 cells in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Dermatol Sci* 2009, 53(3):228-231.
81. Crotty S: T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014, 41(4):529-542.
82. Qi H, Chen X, Chu C, Lu P, Xu H, Yan J: Follicular T-helper cells: controlled localization and cellular interactions. *Immunol Cell Biol* 2014, 92(1):28-33.
83. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ: PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 2010, 11(6):535-542.
84. Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Romo-Tena J, Ibarra-Sanchez MJ, Alcocer-Varela J: Follicular helper T cells poise immune responses to the development of autoimmune pathology. *Autoimmun Rev* 2011, 10(6):325-330.
85. Niu J, Song Z, Yang X, Zhai Z, Zhong H, Hao F: Increased circulating follicular helper T cells and activated B cells correlate with disease severity in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015, 29(9):1791-1796.

86. Saito R, Onodera H, Tago H, Suzuki Y, Shimizu M, Matsumura Y et al: Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol* 2005, 170(1-2):172-178.
87. Li XY, Wu ZB, Ding J, Zheng ZH, Li XY, Chen LN et al: Role of the frequency of blood CD4(+) CXCR5(+) CCR6(+) T cells in autoimmunity in patients with Sjogren's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 422(2):238-244.
88. Li Q, Liu Z, Dang E, Jin L, He Z, Yang L et al: Follicular helper T Cells (Tfh) and IL-21 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *PloS one* 2013, 8(7):e68145.
89. Ioannides D, Lazaridou E, Rigopoulos D: Pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008, 22(12):1478-1496.
90. Küçükoğlu R, Babuna G: Otoimmün büllöz hastalıkların klinik tanısı. *Türkderm* 2011, 45(1)(2011):16-25.
91. Uzun S, Durdu M: The specificity and sensitivity of Nikolskiy sign in the diagnosis of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2006, 54(3):411-415.
92. Pisanti S, Sharav Y, Kaufman E, Posner LN: Pemphigus vulgaris: incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex, and initial lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974, 38(3):382-387.
93. Hale EK, Bystryk JC: Laryngeal and nasal involvement in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2001, 44(4):609-611.
94. Amichai B, Grunwald MH, Gasper N, Finkelstein E, Halevy S: A case of pemphigus vulgaris with esophageal involvement. *J Dermatol* 1996, 23(3):214-215.
95. Batta K, Munday PE, Tatnall FM: Pemphigus vulgaris localized to the vagina presenting as chronic vaginal discharge. *Br J Dermatol* 1999, 140(5):945-947.
96. Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooh M, Esmaili N, Balighi K, Hallaji Z et al: Pemphigus: analysis of 1209 cases. *Int J Dermatol* 2005, 44(6):470-476.
97. Cahali JB, Kakuda EY, Santi CG, Maruta CW: Nail manifestations in pemphigus vulgaris. *Rev Hosp Clin* 2002, 57(5):229-234.

98. Schlesinger N, Katz M, Ingber A: Nail involvement in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2002, 146(5):836-839.
99. Lee HE, Wong WR, Lee MC, Hong HS: Acute paronychia heralding the exacerbation of pemphigus vulgaris. *Int J Clin Pract* 2004, 58(12):1174-1176.
100. Ishii N, Maeyama Y, Karashima T, Nakama T, Kusuhara M et al: A clinical study of patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: an 11-year retrospective study (1996-2006). *Clin Exp Dermatol* 2008, 33(5):641-643.
101. Micali G, Musumeci ML, Nasca MR: Epidemiologic analysis and clinical course of 84 consecutive cases of pemphigus in eastern Sicily. *Int J Dermatol* 1998, 37(3):197-200.
102. Kneisel A, Hertl M: Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Ges* 2011, 9(10):844-856; quiz 857.
103. Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C et al: Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. *J Am Acad Dermatol* 1989, 20(4):657-669.
104. Leibold AM, Bennion S, David-Bajar K, Schleve MJ: Occurrence of positive immunofluorescence in the dermo-epidermal junction of sun-exposed skin of normal adults. *J Cutan Pathol* 1994, 21(3):200-206.
105. Kaplan I, Hodak E, Ackerman L, Mimouni D, Anhalt GJ, Calderon S: Neoplasms associated with paraneoplastic pemphigus: a review with emphasis on non-hematologic malignancy and oral mucosal manifestations. *Oral Oncol* 2004, 40(6):553-562.
106. Zhu X, Zhang B: Paraneoplastic pemphigus. *J Dermatol* 2007, 34(8):503-511.
107. Kimyai-Asadi A, Jih MH: Paraneoplastic pemphigus. *Int J Dermatol* 2001, 40(6):367-372.

108. Nguyen VT, Ndoye A, Bassler KD, Shultz LD, Shields MC, Ruben BS et al: Classification, clinical manifestations, and immunopathological mechanisms of the epithelial variant of paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome: a reappraisal of paraneoplastic pemphigus. *Arch Dermatol* 2001, 137(2):193-206.
109. Baghmar S, Kumar S, Gupta SD, Raina V: Follicular dendritic cell sarcoma with paraneoplastic pemphigus: Rare case and a brief review of literature. *Indian journal of medical and paediatric oncology : Indian J Med Paediatr Oncol* 2013, 34(4):317-319.
110. Menenakos C, Braumann C, Hartmann J, Jacobi CA: Retroperitoneal Castleman's tumor and paraneoplastic pemphigus: report of a case and review of the literature. *World J Surg Oncol* 2007, 5:45.
111. Camisa C, Helm TN: Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasia-induced autoimmune disease. *Arch Dermatol* 1993, 129(7):883-886.
112. Masu T, Okuyama R, Tsunoda T, Hashimoto T, Aiba S: Paraneoplastic pemphigus associated with malignant gastrointestinal stromal tumour. *Acta Derm Venereol* 2010, 90(1):89-90.
113. Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ: Paraneoplastic pemphigus. *Dermatol Clin* 1993, 11(3):473-481.
114. Ishii K, Amagai M, Komai A, Ebihara T, Chorzelski TP, Jablonska S et al: Desmoglein 1 and desmoglein 3 are the target autoantigens in herpetiform pemphigus. *Arch Dermatol* 1999, 135(8):943-947.
115. Brenner S, Bialy-Golan A, Ruocco V: Drug-induced pemphigus. *Clin Dermatol* 1998, 16(3):393-397.
116. Ruocco V, Pisani M: Induced pemphigus. *Arch Dermatol Res* 1982, 274(1-2):123-140.
117. Kneisel A, Hertl M: Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011, 9(11):927-947.
118. Ruocco V, Ruocco E: Tzanck smear, an old test for the new millennium: when and how. *Int J Dermatol* 1999, 38(11):830-834.

119. Durdu M, Baba M, Seckin D: The value of Tzanck smear test in diagnosis of erosive, vesicular, bullous, and pustular skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 2008, 59(6):958-964.
120. Medak H, Burlakow P, McGrew EA, Tiecke R: The cytology of vesicular conditions affecting the oral mucosa: pemphigus vulgaris. *Acta Cytol* 1970, 14(1):11-21.
121. Nieboer C, Beljaards R, van der Veen JP: Rosette-formation in herpes simplex and herpes zoster lesions as demonstrated in Tzanck smears. *Arch Dermatol Res* 1987, 279(4):283-284.
122. Hertl M: Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 2000, 122(2):91-100.
123. Erkin G: Otoimmün Büllöz Hastalıkların Histopatolojik Tanısı. *Türkderm* 2011, 45.Özel Sayı 1 26-30.
124. Stanley JR: Pemphigus. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6nd ed, New York: McGraw-Hill Company. 2003:558-567.
125. Eyre RW, Stanley JR: Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. *J Exp Med* 1987, 165(6):1719-1724.
126. Beutner EH, Lever WF, Witebsky E, Jordon R, Chertock B: Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Response to an Intercellular Substance of Epidermis. *JAMA* 1965, 192:682-688.
127. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF: Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* 1967, 200(9):751-756.
128. Uzun S: Otoimmün Büllöz Hastalıkların Tanısında İmmüno Floresan Bulgular. *Türkderm* 2011, 45 Özel Sayı 1:31-35.
129. Mutasim DF, Adams BB: Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001, 45(6):803-822; quiz 822-804.
130. Joly P, Litrowski N: Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol* 2011, 29(4):432-436.

131. Supapannachart N, Mutasim DF: The distribution of IgA pemphigus antigen in human skin and the role of IgA anti-cell surface antibodies in the induction of intraepidermal acantholysis. *Arch Dermatol* 1993, 129(5):605-608.
132. Helou J, Allbritton J, Anhalt GJ: Accuracy of indirect immunofluorescence testing in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1995, 32(3):441-447.
133. Chorzelski TP, Von Weiss JF, Lever WF: Clinical significance of autoantibodies in pemphigus. *Arch Dermatol* 1966, 93(5):570-576.
134. Judd KP, Lever WF: Correlation of antibodies in skin and serum with disease severity in pemphigus. *Arch Dermatol* 1979, 115(4):428-432.
135. Zillikens D: Diagnosis of autoimmune bullous skin diseases. *Clin Lab* 2008, 54(11-12):491-503.
136. Eming R, Hertl M, Autoimmune Diagnostics Working G: Autoimmune bullous disorders. *Clin Chem Lab Med* 2006, 44(2):144-149.
137. Rose C, Armbruster FP, Ruppert J, Igl BW, Zillikens D, Shimanovich I: Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol* 2009, 61(1):39-43.
138. Harman KE, Gratian MJ, Seed PT, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM: Diagnosis of pemphigus by ELISA: a critical evaluation of two ELISAs for the detection of antibodies to the major pemphigus antigens, desmoglein 1 and 3. *Clin Exp Dermatol* 2000, 25(3):236-240.
139. Tampoia M, Giavarina D, Di Giorgio C, Bizzaro N: Diagnostic accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to detect anti-skin autoantibodies in autoimmune blistering skin diseases: a systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2012, 12(2):121-126.
140. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T et al: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999, 140(2):351-357.

141. Akman A, Uzun S, Alpsoy E: Immunopathologic features of pemphigus in the east Mediterranean region of Turkey: a prospective study. *Skinmed* 2010, 8(1):12-16.
142. Hallaji Z, Mortazavi H, Lajevardi V, Tamizifar B, AmirZargar A, Daneshpazhooh M et al: Serum and salivary desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in pemphigus vulgaris: correlation with phenotype and severity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010, 24(3):275-280.
143. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM: The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol* 2001, 144(4):775-780.
144. Bystryń JC, Akman A, Jiao D: Limitations in enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies against desmogleins 1 and 3 in patients with pemphigus. *Arch Dermatol* 2002, 138(9):1252-1253.
145. Cheng SW, Kobayashi M, Kinoshita-Kuroda K, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T: Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. *Br J Dermatol* 2002, 147(2):261-265.
146. Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Chorzelski TP, Bhogal BS, Black MM et al: Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 1995, 104(5):829-834.
147. Poot AM, Diercks GF, Kramer D, Schepens I, Klunder G, Hashimoto T et al: Laboratory diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 2013, 169(5):1016-1024.
148. Ishiko A, Shimizu H: Electron microscopy in diagnosis of autoimmune bullous disorders. *Clin Dermatol* 2001, 19(5):631-637.
149. Tampoia M, Zucano A, Villalta D, Antico A, Bizzaro N: Anti-skin specific autoantibodies detected by a new immunofluorescence multiplex biochip method in patients with autoimmune bullous diseases. *Dermatology* 2012, 225(1):37-44.

150. van Beek N, Rentzsch K, Probst C, Komorowski L, Kasperkiewicz M, Fechner K et al: Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases: prospective comparison of the BIOCHIP mosaic-based indirect immunofluorescence technique with the conventional multi-step single test strategy. *Orphanet J Rare Dis* 2012, 7:49.
151. Stanley JR: Pemphigus. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Loffell DJ, editors *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* 7th ed Vol 1 United States of America: McGraw-Hill 2007:459-474.
152. Kaya Tİ: İntraepidermal Otoimmün Büllöz Hastalıkların Tedavisi. *Türkderm* 2011, 45 Suppl 1:44-53.
153. Harman KE, Albert S, Black MM, British Association of D: Guidelines for the management of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2003, 149(5):926-937.
154. Kanwar AJ, Dhar S: Factors responsible for death in patients with pemphigus. *J Dermatol* 1994, 21(9):655-659.
155. Lever WF, White H: Treatment of pemphigus with corticosteroids. Results obtained in 46 patients over a period of 11 years. *Arch Dermatol* 1963, 87:12-26.
156. Hirone T: Pemphigus: a survey of 85 patients between 1970 and 1974. *The J Dermatol* 1978, 5(2):43-47.
157. Rosenberg FR, Sanders S, Nelson CT: Pemphigus: a 20-year review of 107 patients treated with corticosteroids. *Arch Dermatol* 1976, 112(7):962-970.
158. Ratnam KV, Phay KL, Tan CK: Pemphigus therapy with oral prednisolone regimens. A 5-year study. *Int J Dermatol* 1990, 29(5):363-367.
159. Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, Marinovic B, Uzun S, Yayli S et al: Pemphigus. S2 Guideline for diagnosis and treatment--guided by the European Dermatology Forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015, 29(3):405-414.
160. Martin LK, Werth V, Villanueva E, Segall J, Murrell DF: Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *The Cochrane Database Syst Rev* 2009(1):CD006263.

161. Martin LK, Werth VP, Villaneuva EV, Murrell DF: A systematic review of randomized controlled trials for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 2011, 64(5):903-908.
162. Mentink LF, Mackenzie MW, Toth GG, Laseur M, Lambert FP, Veeger NJ et al: Randomized controlled trial of adjuvant oral dexamethasone pulse therapy in pemphigus vulgaris: PEMPULS trial. *Arch Dermatol* 2006, 142(5):570-576.
163. Roujeau JC: Pulse glucocorticoid therapy. The 'big shot' revisited. *Arch Dermatol* 1996, 132(12):1499-1502.
164. Toth GG, Westerlaken BO, Eilders M, Laseur M, Jonkman MF, Uges DR: Dexamethasone pharmacokinetics after high-dose oral therapy for pemphigus. *Ann Pharmacother* 2002, 36(6):1108-1109.
165. Hofmann SC, Kautz O, Hertl M, Sticherling M, Zillikens D, Bruckner-Tuderman L: Results of a survey of German dermatologists on the therapeutic approaches to pemphigus and bullous pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009, 7(3):227-233.
166. Herbst A, Bystryn JC: Patterns of remission in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2000, 42(3):422-427.
167. Beissert S, Mimouni D, Kanwar AJ, Solomons N, Kalia V, Anhalt GJ: Treating pemphigus vulgaris with prednisone and mycophenolate mofetil: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *J Invest Dermatol* 2010, 130(8):2041-2048.
168. Beissert S, Werfel T, Frieling U, Bohm M, Sticherling M, Stadler R et al: A comparison of oral methylprednisolone plus azathioprine or mycophenolate mofetil for the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2006, 142(11):1447-1454.
169. Chams-Davatchi C, Esmaili N, Daneshpazhooh M, Valikhani M, Balighi K, Hallaji Z et al: Randomized controlled open-label trial of four treatment regimens for pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2007, 57(4):622-628.

170. Chams-Davatchi C, Mortazavizadeh A, Daneshpazhooh M, Davatchi F, Balighi K, Esmaili N et al: Randomized double blind trial of prednisolone and azathioprine, vs. prednisolone and placebo, in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013, 27(10):1285-1292.
171. Ioannides D, Apalla Z, Lazaridou E, Rigopoulos D: Evaluation of mycophenolate mofetil as a steroid-sparing agent in pemphigus: a randomized, prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012, 26(7):855-860.
172. Aberer W, Wolff-Schreiner EC, Stingl G, Wolff K: Azathioprine in the treatment of pemphigus vulgaris. A long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol* 1987, 16(3 Pt 1):527-533.
173. Burton JL, Greaves MW, Marks J, Dawber RP: Azathioprine in pemphigus vulgaris. *Br Med J* 1970, 3(5714):84-86.
174. Roenigk HH, Jr., Deodhar S: Pemphigus treatment with azathioprine. Clinical and immunologic correlation. *Arch Dermatol* 1973, 107(3):353-357.
175. Wolff K, Schreiner E: Immunosuppressive therapy of pemphigus vulgaris. Preliminary results of azathioprine (Imuran) treatment). *Arch Klin Exp Dermatol* 1969, 235(1):63-77.
176. Meggitt SJ, Anstey AV, Mohd Mustapa MF, Reynolds NJ, Wakelin S: British Association of Dermatologists' guidelines for the safe and effective prescribing of azathioprine 2011. *Br J Dermatol* 2011, 165(4):711-734.
177. Mutasim DF: Management of autoimmune bullous diseases: pharmacology and therapeutics. *J Am Acad Dermatol* 2004, 51(6):859-877; quiz 878-880.
178. Chaidemenos G, Apalla Z, Koussidou T, Papagarifallou I, Ioannides D: High dose oral prednisone vs. prednisone plus azathioprine for the treatment of oral pemphigus: a retrospective, bi-centre, comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011, 25(2):206-210.
179. Schiavo AL, Puca RV, Ruocco V, Ruocco E: Adjuvant drugs in autoimmune bullous diseases, efficacy versus safety: Facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010, 28(3):337-343.

180. Nousari CH, Brodsky R, Anhalt GJ: Evaluating the role of immunoablative high-dose cyclophosphamide therapy in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2003, 49(1):148-150.
181. Pasricha JS, Khaitan BK, Raman RS, Chandra M: Dexamethasone-cyclophosphamide pulse therapy for pemphigus. *Int J Dermatol* 1995, 34(12):875-882.
182. Fleischli ME, Valek RH, Pandya AG: Pulse intravenous cyclophosphamide therapy in pemphigus. *Arch Dermatol* 1999, 135(1):57-61.
183. Cummins DL, Mimouni D, Anhalt GJ, Nousari CH: Oral cyclophosphamide for treatment of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 2003, 49(2):276-280.
184. Toth GG, Jonkman MF: Therapy of pemphigus. *Clin Dermatol* 2001, 19(6):761-767.
185. Olszewska M, Kolacinska-Strasz Z, Sulej J, Labecka H, Cwikla J, Natorka U et al: Efficacy and safety of cyclophosphamide, azathioprine, and cyclosporine (ciclosporin) as adjuvant drugs in pemphigus vulgaris. *Am J Clin Dermatol* 2007, 8(2):85-92.
186. Kandan S, Thappa DM: Outcome of dexamethasone-cyclophosphamide pulse therapy in pemphigus: a case series. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009, 75(4):373-378.
187. Mahajan VK, Sharma NL, Sharma RC, Garg G: Twelve-year clinico-therapeutic experience in pemphigus: a retrospective study of 54 cases. *Int J Dermatol* 2005, 44(10):821-827.
188. Gurcan HM, Ahmed AR: Analysis of current data on the use of methotrexate in the treatment of pemphigus and pemphigoid. *Br J Dermatol* 2009, 161(4):723-731.
189. Baum S, Greenberger S, Samuelov L, Solomon M, Lyakhovitsky A, Trau H et al: Methotrexate is an effective and safe adjuvant therapy for pemphigus vulgaris. *Eur J Dermatol* 2012, 22(1):83-87.
190. Ioannides D, Chrysomallis F, Bystryjn JC: Ineffectiveness of cyclosporine as an adjuvant to corticosteroids in the treatment of pemphigus. *Arch Dermatol* 2000, 136(7):868-872.

191. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S et al: A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2009, 60(4):595-603.
192. Ahmed AR, Dahl MV: Consensus statement on the use of intravenous immunoglobulin therapy in the treatment of autoimmune mucocutaneous blistering diseases. *Arch Dermatol* 2003, 139(8):1051-1059.
193. Aoyama Y: What's new in i.v. immunoglobulin therapy and pemphigus: high-dose i.v. immunoglobulin therapy and its mode of action for treatment of pemphigus. *J Dermatol* 2010, 37(3):239-245.
194. Ahmed AR, Gurcan HM: Use of intravenous immunoglobulin therapy during pregnancy in patients with pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011, 25(9):1073-1079.
195. Behzad M, Mobs C, Kneisel A, Moller M, Hoyer J, Hertl M et al: Combined treatment with immunoadsorption and rituximab leads to fast and prolonged clinical remission in difficult-to-treat pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2012, 166(4):844-852.
196. Kasperkiewicz M, Shimanovich I, Meier M, Schumacher N, Westermann L, Kramer J et al: Treatment of severe pemphigus with a combination of immunoadsorption, rituximab, pulsed dexamethasone and azathioprine/mycophenolate mofetil: a pilot study of 23 patients. *Br J Dermatol* 2012, 166(1):154-160.
197. Zillikens D, Derfler K, Eming R, Fierlbeck G, Goebeler M, Hertl M et al: Recommendations for the use of immunoapheresis in the treatment of autoimmune bullous diseases. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007, 5(10):881-887.
198. Eming R, Rech J, Barth S, Kalden JR, Schuler G, Harrer T et al: Prolonged clinical remission of patients with severe pemphigus upon rapid removal of desmoglein-reactive autoantibodies by immunoadsorption. *Dermatology* 2006, 212(2):177-187.
199. Bjarnason B, Skoglund C, Flosadottir E: Childhood pemphigus vulgaris treated with dapsone: a case report. *Pediatr Dermatol* 1998, 15(5):381-383.
200. Haim S, Friedman-Birnbaum R: Dapsone in the treatment of pemphigus vulgaris. *Dermatologica* 1978, 156(2):120-123.

201. Piamphongsant T: Pemphigus controlled by dapsone. *Br J Dermatol* 1976, 94(6):681-686.
202. Werth VP, Fivenson D, Pandya AG, Chen D, Rico MJ, Albrecht J et al: Multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of dapsone as a glucocorticoid-sparing agent in maintenance-phase pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 2008, 144(1):25-32.
203. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R et al: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994, 83(2):435-445.
204. Mouquet H, Musette P, Gougeon ML, Jacquot S, Lemerrier B, Lim A et al: B-cell depletion immunotherapy in pemphigus: effects on cellular and humoral immune responses. *J Invest Dermatol* 2008, 128(12):2859-2869.
205. Bilgic A, Akman-Karakas A, Ergün E, Uzun S: Dirençli pemfigus vulgaris olgularında ritüksimab tedavisinin etkinlik ve güvenilirliği. *Türkderm* 2015, 49(2):117-124.
206. Schmidt E, Goebeler M, Zillikens D: Rituximab in severe pemphigus. *Ann N Y Acad Sci* 2009, 1173:683-691.
207. Mignogna MD, Fortuna G, Leuci S, Adamo D, Dell'Aversana Orabona G, Ruoppo E: Adjuvant triamcinolone acetonide injections in oro-pharyngeal pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010, 24(10):1157-1165.
208. Cohen SN, Lim RP, Paul CJ, Abdullah A: Equal efficacy of topical tacrolimus and clobetasone butyrate in pemphigus foliaceus. *Int J Dermatol* 2006, 45(11):1379.
209. Iraj F, Asilian A, Siadat AH: Pimecrolimus 1% cream in the treatment of cutaneous lesions of pemphigus vulgaris: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Drugs Dermatol* 2010, 9(6):684-686.
210. Akman A, Kacaroglu H, Yilmaz E, Alpsoy E: Periodontal status in patients with pemphigus vulgaris. *Oral Dis* 2008, 14(7):640-643.

211. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L et al: Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2008, 58(6):1043-1046.
212. David M, Weissman-Katzenelson V, Ben-Chetrit A, Hazaz B, Ingber A, Sandbank M: The usefulness of immunofluorescent tests in pemphigus patients in clinical remission. *Br J Dermatol* 1989, 120(3):391-395.
213. Weissman V, Feuerman EJ, Joshua H, Hazaz B: The correlation between the antibody titers in sera of patients with Pemphigus vulgaris and their clinical state. *J Invest Dermatol* 1978, 71(2):107-109.
214. Creswell SN, Black MM, Bhogal B, Skeete MV: Correlation of circulating intercellular antibody titres in pemphigus with disease activity. *Clin Exp Dermatol* 1981, 6(5):477-483.
215. Bystryn JC, Steinman NM: The adjuvant therapy of pemphigus. An update. *Arch Dermatol* 1996, 132(2):203-212.
216. Ratnam KV, Pang BK: Pemphigus in remission: value of negative direct immunofluorescence in management. *J Am Acad Dermatol* 1994, 30(4):547-550.
217. Nair PS, Moorthy PK, Yogiragan K: A study of mortality in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005, 71(1):23-25.
218. Uzun S: Pemfigusun Güncel Tedavisi ve Yönetimi. *Turk J Dermatol* 2012, 6:91-101.
219. Ma CS, Deenick EK: Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol Cell Biol* 2014, 92(1):64-71.
220. Wang J, Shan Y, Jiang Z, Feng J, Li C, Ma L et al: High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2013, 174(2):212-220.
221. Yang X, Yang J, Chu Y, Xue Y, Xuan D, Zheng S et al: T follicular helper cells and regulatory B cells dynamics in systemic lupus erythematosus. *PLoS one* 2014, 9(2):e88441.

222. Xu X, Shi Y, Cai Y, Zhang Q, Yang F, Chen H et al: Inhibition of increased circulating Tfh cell by anti-CD20 monoclonal antibody in patients with type 1 diabetes. *PloS one* 2013, 8(11):e79858.
223. Spolski R, Leonard WJ: Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2014, 13(5):379-395.
224. Tavakolpour S: Interleukin 21 as a new possible player in pemphigus: Is it a suitable target? *Int Immunopharmacol* 2016, 34:139-145.
225. Asothai R, Anand V, Das D, Antil PS, Khandpur S, Sharma VK et al: Distinctive Treg associated CCR4-CCL22 expression profile with altered frequency of Th17/Treg cell in the immunopathogenesis of Pemphigus Vulgaris. *Immunobiology* 2015, 220(10):1129-1135.