



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

İMMÜNFLORESAN MOZAİK TABANLI BİYOÇİP YÖNTEMİNİN PEMFİGUS VE BÜLLÖZ PEMFİGOİD TANISINDA DEĞERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Birgül ÖZKESİCİ

Antalya, 2015



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

İMMÜNFLORESAN MOZAİK TABANLI BİYOÇİP YÖNTEMİNİN PEMFİGUS VE BÜLLÖZ PEMFİGOİD TANISINDA DEĞERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Birgül ÖZKESİCİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Soner UZUN

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2014

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2014.04.0103.008 Proje No ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Soner UZUN'a, eğitim sürecimde engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Erkan ALPSOY, Prof. Dr. Ertan YILMAZ, Prof. Dr. Özlem DİCLE, Prof. Dr. Ülker GÜL ve Prof. Dr. Ayşe AKMAN KARAKAŞ'a teşekkür ederim.

Tezime dahil edebileceğim hastaları bana yönlendiren ve tezimin yazımı aşamasında emeği geçen değerli meslektaşlarıma, istatistiksel değerlendirmede yardımlarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Prof. Dr. Levent DÖNMEZ'e ve tezime dahil ettiğim hastaların ve kontrol grubunun ELİSA tetkiklerini yürüten Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Doç. Dr. Derya MUTLU'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Çizelgeler Dizini	v
Şekiller Dizini	vii
Grafikler Dizini	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sınıflandırma	4
2.2. Epidemiyoloji	5
2.2.1. Pemfigusun epidemiyolojisi	5
2.2.2. BP'nin epidemiyolojisi	6
2.3. Etyopatogenezi	7
2.3.1. Pemfigusun etyopatogenezi	7
2.3.2. BP etyopatogenezi	13
2.4. Klinik	15
2.4.1. Pemfigusun kliniği	15
2.4.2. BP kliniği	19
2.5. Tanı	20
2.5.1. Sitoloji	20
2.5.2. Histopatoloji	20
2.5.3. Direkt immünfloresan	22
2.5.4. İndirekt immünfloresan	23
2.5.5. ELİSA	24
2.5.6. İmmünoblotting ve immünopresipitasyon	26
2.5.7. Elektron mikroskopisi	26
2.5.8. İmmünelektron mikroskopisi	27
2.5.9. İİF mozaik tabanlı BİYOÇİP	27
2.5.10. Diğer laboratuvar bulgular	27
2.6. Ayırıcı Tanı	27
2.6.1. Pemfigusta ayırıcı tanı	27
2.6.2. BP'de ayırıcı tanı	28

	<u>Sayfa</u>
2.7. Tedavi	29
2.7.1. Pemfigus tedavisi	29
2.7.2. BP tedavisi	31
2.8. Skorlama Sistemleri	32
2.9. Prognoz ve Diğer Hastalıklar ile İlişkisi	32
2.9.1. Pemfigusta prognoz ve diğer hastalıklar ile ilişki	32
2.9.2. BP’de prognoz ve diğer hastalıklar ile ilişkisi	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Tanımlanması	34
3.2. EUROIMMUN Mozaik Tabanlı İİF BİYOÇİP Yöntemi	35
3.3. ELİSA Testi	39
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	40
4. BULGULAR	41
4.1. Pemfigus Grubu Verileri	41
4.2. BP Grubu Verileri	45
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR	55
7. ÖZET	56
8. ABSTRACT	57
9. KAYNAKLAR	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABSİS	Autoimmune bullous skin disorder intensity score
BMZ	Bazal membran zonu
BP	Büllöz pemfigoid
C3	Kompleman 3
DEB	Dermoepidermal bileşke
Dsc	Desmokolin
Dsg	Desmoglein
DİF	Direkt immünofloresan
ELİSA	Enzim linked immunosorbent assay
EM	Elektron mikroskopisi
GVHD	Graft versus host disease
HEK	Human embryonic kidney
HLA	Human lökosit antijenleri
HSV	Herpes simpleks virüs
İEN	İntraepidermal nötrofilik
Ig	İmmünglobülin
İİF	İndirekt immünofloresan
İViG	İntravenöz immünglobulin
İSA	İntersellüler aralık
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
NaCL	Sodyum klorür
OBH	Otoimmün büllü hastalıklar
PDAI	Pemfigus hastalığı alan indeksi
PE	Pemfigus eritematozus
PF	Pemfigus foliaceus
PH	Pemfigus herpetiformis
PKC	Protein kinaz C
PNP	Paraneoplastik pemfigus
PV	Pemfigus vulgaris
PVE	Pemfigus vegetans
SPD	Subkorneal püstüler dermatoz
TAİD	Tuzda ayrıştırılmış insan derisi
TPMT	Tiyopürin metiltransferaz
uPA	Ürokinaz tip plazminojen aktivatör

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Pemfigusun sınıflandırması 1	4
2.2. Subepidermal OBH	4
2.3. Pemfigus gelişimine neden olan veya tetikleyen ilaçlar	13
2.4. Pemfigus tedavisi	29
3.1. Mozaik tabanlı İİF BİYOÇİP slaytı (EUROIMMUN-Mozaik 7)	35
3.2. Hasta serumlarının dilüsyonu (a) ve substratlarla inkübasyonu (b)	36
3.3. İlk inkübasyon sonrası PBS-Tween ile yıkama işlemi	36
3.4. Floresan işaretli anti-human antikorlarla yapılan ikinci inkübasyon	37
3.5. İşlem sonrası BİYOÇİP slaytının immunfloresan mikroskopunda incelenmesi	37
3.6. PV tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta İSA ve anti-Dsg3 pozitifliği)	38
3.7. PF tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta İSA ve anti-Dsg1 pozitifliği)	38
3.8. BP tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta BMZ boyunca lineer ve TAİD'de epidermal depolanma, anti-BP180 ve anti-BP230 pozitifliği)	39
4.1. Pemfigus ve kontrol grubu hastalarının demografik ve klinik verileri	41
4.2. Pemfigus tanısında BİYOÇİP yönteminin değeri	42
4.3. Pemfigus hastalarında İSA pozitifliğini saptamada DİF ve BİYOÇİP yönteminin uyumu	42

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.4. Pemfigus ve kontrol grubunda anti-Dsg1 otoantikörlerini saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yönteminin uyumu	44
4.5. Pemfigus ve kontrol grubunda anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yönteminin uyumu	45
4.6. BP ve kontrol grubu hastalarının demografik ve klinik verileri	46
4.7. BP tanısında BİYOÇİP yönteminin değeri	46
4.8. BP ve kontrol grubunda anti-BP180 otoantikörlerini saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yönteminin uyumu	49
5.1. Pemfigus tanısında BİYOÇİP yönteminin sensitivite ve spesifitesinin araştırıldığı çalışmalar ve sonuçları	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. OBH’da hedef alınan otoantijenler	3
2.2. Pemfigus otoantijenleri	8
2.3. Pemfigusta akantoliz oluşumuna ilişkin hipotez (kompansasyon teorisi)	10
2.4. Pemfigus patogenezinde T ve B hücrelerinin rolü	11
2.5. BP fizyopatolojisi	14
2.6. BP otoantijenleri	15
2.7. Kliniğimizde uygulanan pemfigus tedavi algoritması	30
2.8. Kliniğimizde uygulanan BP tedavi algoritması	32
3.1. Mozaik tabanlı İİF BİYOÇİP slaytı (EUROIMMUN-Mozaik 7)	35
3.2. Hasta serumlarının dilüsyonu (a) ve substratlarla inkübasyonu (b)	36
3.3. İlk inkübasyon sonrası PBS-Tween ile yıkama işlemi	36
3.4. Floresan işaretli anti-human antikorlarla yapılan ikinci inkübasyon	37
3.5. İşlem sonrası BİYOÇİP slaytının immunfloresan mikroskopunda incelenmesi	37
3.6. PV tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta İSA ve anti-Dsg3 pozitifliği)	38
3.7. PF tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta İSA ve anti-Dsg1 pozitifliği)	38
3.8. BP tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta BMZ boyunca lineer ve TAİD’de epidermal depolanma, anti-BP180 ve anti-BP230 pozitifliği)	39
4.1. İSA pozitifliği (<i>BİYOÇİP_maymun özeagusu, x600</i>)	43
4.2. Anti-Dsg3 pozitifliği (<i>BİYOÇİP_HEK290 hücreleri, x600</i>)	44
4.3. Epidermal lineer BMZ depolanması (<i>BİYOÇİP_TAİD, x600</i>)	48
4.4. Anti-BP180 pozitifliği (<i>BİYOÇİP_NC16A.4X, x600</i>)	49

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. BİYOÇİP yönteminin İSA, anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 pozitifliği ile pemfigus tanısı koymadaki sensitivite ve spesifisitesi	43
4.2. BİYOÇİP yönteminin TAİD, anti-BP180 ve anti-BP230 pozitifliği ile BP tanısı koymadaki sensitivite ve spesifisitesi	47

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Otoimmün büllü hastalıklar (OBH), epidermis veya dermoepidermal bileşkenin (DEB) yapısal proteinlerine karşı otoantikor gelişimi ve klinik olarak deri ve/veya mukozalarda bül ve erezyon oluşumu ile karakterize nadir görülen bir hastalık grubudur. Pemfigus ve büllöz pemfigoid (BP) iki ana alt grubunu oluşturur. Pemfigusda otoantikorlar hücreler arası bağları hedef alır, deri ve/veya mukozalarda intraepidermal bül oluşur. Büllöz pemfigoidde ise otoantikorlar bazal membran zonundaki (BMZ) hemidesmozomları hedef alır ve subepidermal bül oluşumu gözlenir. Hem pemfigus hem de BP tanısında direkt immünfloresan (DİF) altın standart tanı testidir. ELİSA da tanıda oldukça sensitif ve spesifiktir (1,2). Ancak tanıda kullanılan her iki yöntem de pahalı, iş yükü fazla olan ve zaman alıcı testlerdir. Son dönemlerde tanıda DİF ve ELİSA'dan daha ucuz, pratik ve hızlı yapılabilir bir test elde etmek amacıyla İİF mozaik tabanlı BİYOÇİP yöntemi geliştirilmiştir. OBH'nın tanısında tarama testi olarak kullanılabilecek bir yöntem olarak gelecek vaat etmektedir. Bir BİYOÇİP üzerinde birden fazla antijenik yapının bulunması OBH arasında tek bir serum örneği üzerinden ayırıcı tanı yapma olanağı da sunmaktadır. Bu konuyla ilgili sınırlı sayıda, az sayıda örneklem içeren çalışma bulunmaktadır (3,4,5,6,7).

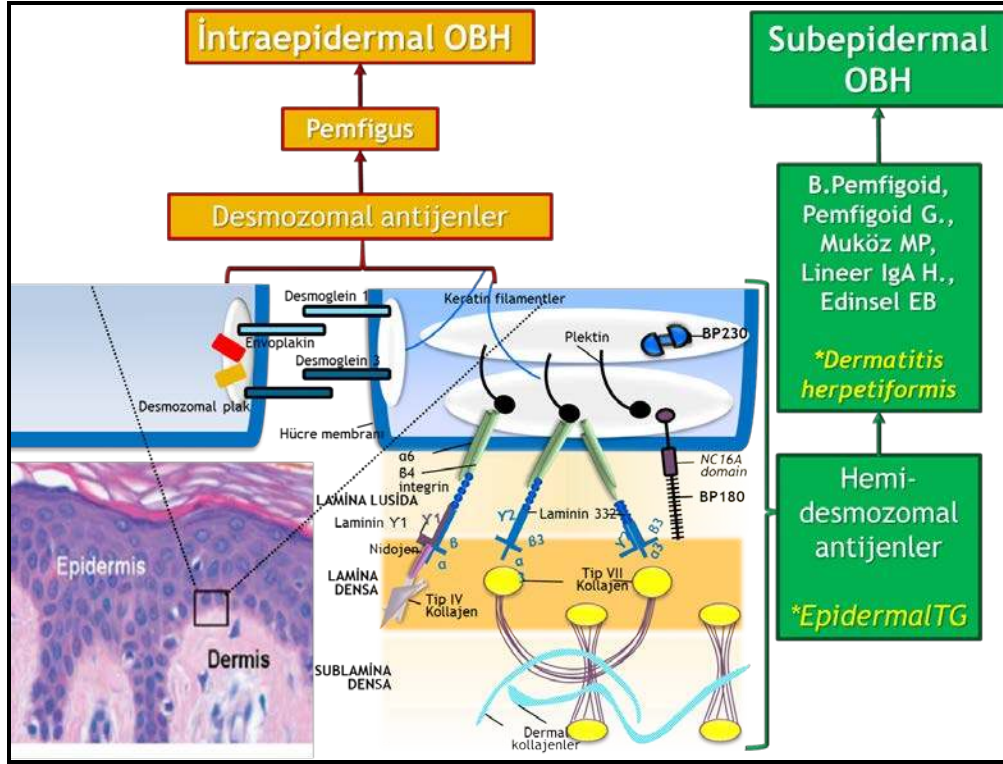
Bu araştırmanın primer amacı bölgemizde klinik, histopatolojik ve immünfloresan ve/veya ELİSA yöntemleri ile pemfigus veya BP tanısı konmuş hastalarda EUROIMMUN indirekt immünfloresan (İİF) mozaik tabanlı BİYOÇİP yöntemini kullanarak, yeni geliştirilmiş bu yöntemin pemfigus ve BP tanısındaki değerini saptamaktır. İkincil amaç ise bu grup hastalıkların rutin tanısında altın standart kabul edilen yöntemler ile BİYOÇİP yönteminin uyumlu olup olmadığını değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

OBH nadir görülmekle birlikte yaşamı tehdit edebilen veya şiddetli morbiditeye neden olabilen hastalıklar olması nedeni ile deri hastalıkları arasında ayrı bir yere ve öneme sahiptir. Epidermis veya DEB'nin yapısal proteinlerine karşı oluşan otoantikorlar ile karakterizedir (Şekil 2.1). Bu otoantikorlar yapısal bütünlüğün bozulmasına ve bül oluşumuna neden olurlar. Pemfigusda büller intraepidermal yerleşimli iken pemfigoid gurubu hastalıklarda subepidermal yerleşimlidir (1,2). Klinik tanıda Nikolsky belirtisi intraepidermal büllöz hastalıkların subepidermal büllöz hastalıklardan ayrılmasına yardımcı olur. Pozitif Nikolsky belirtisi epidermis içinde aktif akantolizin ve bozulmuş yapısal bütünlüğün klinik karşılığıdır, mekanik semptomdur (8,9). Ancak nadiren BP, lineer IgA dermatozu, dermatitis herpetiformis, büllöz liken planus gibi subepidermal hastalıklarda da pozitif olabileceği akılda tutulmalıdır. Bül çatısından veya kenarındaki bül artığından yukarıya doğru çekildiğinde dirençle karşılaşmadan ayrışmanın gerçekleşmesi, sağlam bül üzerine bastırıldığında bül sıvısının komşu derinin altına hafifçe yayılma göstermesi yada lezyonun kenarındaki normal görünümlü deriye burgu biçiminde bastırıldığında erozyon oluşması marjinal Nikolsky belirtisidir. Direkt Nikolsky belirtisi ise bül veya erozyondan uzak normal görünümlü deriye burgu biçiminde bastırıldığında erozyon oluşmasıdır (10). Yapılan çalışmalarda pemfigus hastalarında marjinal Nikolsky bulgusunun sensitivitesi (duyarlılık) %69,2 ve spesifisitesi (seçicilik-özgüllük) %93,8 olarak, direkt Nikolsky bulgusunun ise sensitivitesi %38,4, spesifitesi %100 olarak saptanmıştır. Marjinal Nikolsky bulgusunun sensitivitesi, direkt Nikolsky bulgusunu spesifitesi yüksek bulunmuştur (11). Nikolsky belirtisinin tanısallığı kadar prognostik değeri de bulunmaktadır. Tedavi sırasında negatifleşmesi remisyon işareti sayılırken tedavi sonrası pozitifleşmesi nüksün habercisi olabilmektedir (11,12).

Lever, 1953 yılında, histopatolojik olarak ayrışmanın anatomik lokalizasyonuna göre pemfigus ile pemfigoidin farklı hastalıklar olduğunu bildirmiştir (13). Beutner ve Jordon tarafından, 1960'lı yılların başında, immünfloresan tekniklerle pemfigus ve BP otoantikorlarının keşfi ise OBH'nın tanısında en önemli dönüm noktasıdır (14,15). Pemfigus ve BP antijenlerine karşı oluşan otoantikorların gösterildiği ELİSA yönteminin 1990'ların ortalarında geliştirilmesi de tanıda büyük ilerleme sağlamıştır (16). Tanıda

linik bulgular ve histopatolojik özellikler yeterli değildir, tanı immunfloresan veya ELİSA ile antikorlar gösterilerek doğrulanmalıdır.



Şekil 2.1. OBH’da hedef alınan otoantijenler.

Pemfigus nadir görülen, tedavi edilmediğinde neredeyse her zaman fatal, tedavi edildiğinde dahi hayatı tehdit edebilen kronik seyirli otoimmün büllöz bir hastalıktır. Pemfigus terimi, bül anlamına gelen Yunanca ‘pempnix’ kelimesinden köken alır (17). Pemfigus ismini, ilk kez 1791 yılında Wichmann kullanmıştır (18).

BP ise kronik, subepidermal, otoimmün büllöz bir hastalıktır. Pemfigoid terimi, bül anlamına gelen Yunanca ‘pempnix’ ve tip, form anlamına gelen ‘eidos’ kelimelerinden gelmektedir (19).

Önerilen tedaviler sınırlı sayıdaki yayın ve uzman görüşlerine dayanmaktadır, standart veya ideal tedavi protokolü henüz oluşturulamamıştır. Her iki hastalıkta da tedavide temel yaklaşım sistemik kortikoterapidir. Sistemik steroid yan etkilerini azaltmak amacıyla hastaların çoğunda adjuvan immünosüpresif tedaviler de kullanılmaktadır. Son yıllarda bu hastalıklarda biyolojik ajan tedavileri de gündeme gelmiştir. Yine son yıllarda BP tedavisinde topikal kortikosteroidlerin etkinliği de gösterilmiştir (20,21).

2.1. Sınıflandırma

OBH ayrışmanın anatomik lokalizasyonuna göre intraepidermal ve subepidermal, sırasıyla pemfigus ve pemfigoid grubu, olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Klasik sınıflandırmada pemfigus, epidermisteki ayrışmanın yerine göre derin (suprabazal) ve yüzeysel (subkorneal) ayrışmaya neden olan pemfigus olarak başlıca ikitemel tipe ayrılmıştır (1), Günümüzde OBH'nın sınıflandırılması klinik ve histopatolojik özelliklerin yanı sıra immünofloresan bulguların, etyolojik ve epidemiyolojik özelliklerin bir arada kullanılması esasına dayanır (Çizelge 2.1, Çizelge 2.2) (22).

Çizelge 2.1. Pemfigusun sınıflandırması 1 (22).

○ Pemfigus vulgaris	}	Derin Pemfigus
○ <i>Pemfigus vegetans</i>		
○ Paraneoplastik pemfigus		
○ Pemfigus foliaceus	}	Yüzeysel Pemfigus
○ <i>Pemfigus eritematozus</i>		
○ <i>Fogo selvagem: Endemik tip</i>		
○ ilaç nedenli pemfigus		
○ IgA pemfigusu		

Çizelge 2.2. Subepidermal OBH.

○ Pemfigoid grubunun sınıflandırılması
○ Büllöz pemfigoid
○ Muköz membran pemfigoidi
○ Pemfigoid gestasyones
○ Lineer IgA dermatozu
○ Edinsel epidermolizis bülloza
○ Liken planus pemfigoides
○ Anti-laminin 332 pemfigoidi
○ Anti-p200/anti-laminin γ1 pemfigoidi
○ Dermatitis herpetiformis

Son yıllarda ise immünoblotting (Western blotting) ve ELİSA gibi moleküler yöntemlerle saptanan hedef antijenleri ve otoantikör tipini de içeren bir sınıflandırma gündemdedir (23).

2.2. Epidemiyoloji

Ülkemizde, OBH içerisinde en sık pemfigus vulgaris (PV) görülmekte iken (24), Avrupa kaynaklı çalışmalarda en sık BP bildirilmektedir (25, 26).

2.2.1. Pemfigusun epidemiyolojisi

Pemfigusun dünyadaki yıllık insidansı etnik ve coğrafik farklılıklar göstermekte olup 0,5-16,1/milyon arasında değişmektedir (27). Hastalık tüm etnik grup ve ırklarda görülebilmekle birlikte Yahudilerin Askenazi kolunda ve Akdeniz kökenli insanlarda daha sık görülmektedir (28). Kuzey Amerika’da yapılan bir çalışmada hastalığın sıklığı Yahudi kökenlilerde 32/milyon, diğer etnik kökene sahip olanlarda ise 4,2/milyon olarak bildirilmiştir (29).

PV en sık Avrupa ve ABD’de görülürken pemfigus foliaceus (PF) Afrika’da daha sıktır (30). 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 (27). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise Akdeniz bölgesinde hastalığın insidansı 2,4/milyon olarak bildirilmiştir (24).

Pemfigus formları içinde en sık görülen PV’dir, olguların %70-80’ini oluşturmaktadır (31,32,33). Ülkemizde yapılan çalışmada da pemfigus hastalarının %83,1’i PV tanısı almıştır (24).

PV her yaşta görülebilmekle birlikte, en sık 40-60 yaşları arasında tanı konmaktadır. Kadınlarda ve erkeklerde benzer oranlarda görülür (12,31,34). Etnik kökene bağlı olarak hastalık oluşumunda duyarlılığı arttıran genler farklılık gösterir. Günümüzde HLAII genleri ile PV arasındaki ilişki en güçlü ve en iyi tanımlanandır (35). Literatürde HLADRB1*04, DRB1*14 ve DQB1*05 antijenleri ile PV arasında güçlü birliktelikler gösterilmiştir. Özellikle Askenazi kökenli Yahudilerde hastalığın HLAB1*0402, Avrupa ve Asya kökenli Yahudi olmayan kişilerde hastalığın DRB1*1401/04 ve DQB1*0503 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (36,37). 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 (38). HLA 1 A ve HLA 1 B antijenleri ile de çalışmalar mevcut olup bulgular henüz yeterli değildir (39). Günümüzde genetik alt yapı ile PV'nin biyolojik ve klinik profili arasında ilişki gösterilememiştir (40). Ancak hastalığa duyarlılıktan sorumlu genlerin daha iyi anlaşılması yakın gelecekte hastanın genetik alt yapısına uygun, daha bireysel tedavilerin uygulanmasına olanak sağlayacaktır. Genetik yatkınlık hastalığa neden olan otoimmün patomekanizmayı başlatmak için tek başına yeterli değildir. Monozigotik ikizlerden birinde (41) ve aynı predispozan haplotipe sahip üç kardeşten ikisinde (42) pemfigus gelişmesi bunun kanıtlarıdır. Pemfigus nadiren aile içinde birden fazla bireyde görülmektedir (43,44,45), ancak kalıtsal bir hastalık olarak düşünülmemelidir.

PF sporadik olarak tüm dünyada (en sık Avrupa ve ABD'de) görülebilirken endemik formu Brezilya, Kolombiya gibi Güney Amerika ülkelerinde ve Tunus gibi Kuzey Afrika ülkelerinde daha sık görülür. Nehir kıyılarında yaşayan, ekonomik geliri düşük bireylerde daha sık bildirilmektedir. Klinik, histopatolojik ve immünolojik olarak hastalığın sporadik ve endemik formları arasında fark gözlenmez (46,47). Sporadik form HLA DRB1*0102 ve 0404 ile (48), endemik form ise HLA DRB1*0102 ve 0404, 1402, 1406 ilişkili bulunmuştur (49). Endemik form ergenlik dönemindeki ve 2. dekadadaki bireyleri etkiler ve ailede birden fazla kişide görülebilir. Çevresel faktörler suçlanmakla birlikte neden olabilecek faktörler tanımlanamamıştır (50). İlaçlar, güneş ışınları, mikrobial ajanlar ve malinite olası tetikleyici faktörler olarak bildirilmiştir (51).

Nadir görülen formlardan pemfigus herpetiformis (PH); 1975 yılında Jablonska ve ark.tarafından (52), IgA pemfigusu (Bkz. Çizelge 2.1) ise 1982 yılında Wallach ve ark. tarafından tanımlanmışlardır (53). Paraneoplastik pemfigus (PNP) ise ilk kez 1990 yılında malinitesi olan 5 hastada tanımlanmıştır (54).

2.2.2. BP'nin epidemiyolojisi

Avrupa kaynaklı çalışmalarda BP'in yıllık insidansı 2,5 ile 42,8/milyon arasında değişmektedir (27,55,56) ve OBH içerisinde en sık pemfigoid grubu hastalıklar (%65,8 ve %83,3) bildirilmektedir (25,26). Son dönemde yayınlanan çalışmalarda BP insidansındaki belirgin artış dikkat çekmektedir (57,58). İnsidansdaki artışın nedeni genel popülasyonun yaş ortalamasındaki artış olabileceği gibi günümüzde daha sensitif ve spesifik tanı yöntemlerinin kullanılabilir olması da olabilir. BP genellikle yaşlılarda gözlenir, 70'li yaşların sonlarında başlar. Elli yaşından genç bireylerde oldukça nadir

görülür (insidansı <0,5/milyon) (58). Nadiren çocuklarda da görülebilir (59). Kadın ve erkekte görülme sıklığı eşittir (60). Bazı yayınlarda kadın hakimiyeti bildirilmektedir (27). Yapılan çalışmalarda 80 yaş üzerinde hastalığın insidansının belirgin olarak arttığı bildirilmiştir (61,62). BP'nin de yer aldığı pemfigoid grubu, HLA-DQβ1*0301 ile ilişkilendirilmiştir (63). BP Kafkasyalılarda DQβ1*0301, Japonlarda DQβ1*0304,DQβ1*1101,DQβ1*0302 allelleri ile ilişkili bulunmuştur (1).

2.3. Etyopatogeneze

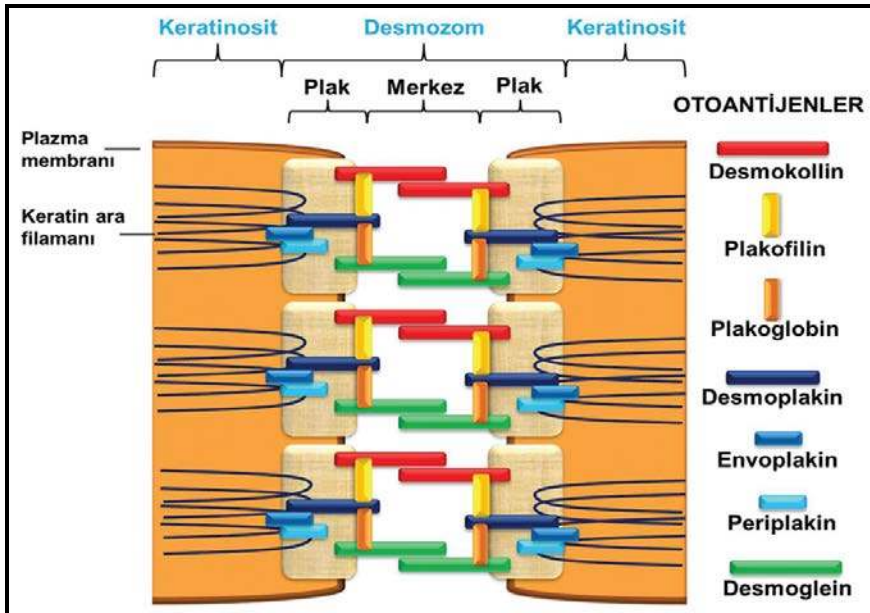
1964'de Beutner ve Jordon tarafından pemfigus hastalarının serumlarında, deri ve müköz membrandaki interselüler antijenleri hedef alan antikorların indirekt immunfloresan yöntemler kullanılarak gösterilmesi ile pemfigusun etyopatogenezindeki anahtar bulunmuştur (14,15). Hemen ardından yine Beutner ve Jordon tarafından indirekt immunfloresan yöntemler kullanılarak BP'nin otoantikorları da tanımlanmıştır. BP'nin etyopatogenezindeki dönüm noktası da yine bu keşiftir (25).

2.3.1. Pemfigusun etyopatogenezi

Tüm pemfigus formlarında temel patoloji akantolizdir. Pemfigus hastalarında akantoliz ilk kez 1943 yılında Civatte tarafından tanımlanmıştır (64). Keratinosit hücre yüzey antijenlerine karşı gelişen interselüler antikorlar kerkinositlerin birbirinden ayrılmasına neden olur. İlk önce interselüler madde çözülür, ardından desmozomlar ayrılır ve epidermis içinde ayrışmalar oluşur. Zamanla bu ayrışmalar büyür ve bül olur (32,65). Tüm pemfigus formları kanda dolaşan ve deride depolanan keratinosit yüzey antijenlerine karşı oluşmuş otoantikorlar ile ilişkilidir (12,66). Aktif hastalığı olan hastaların %80'inde dolaşımda, %90'ında lezyonda veya lezyona komşu sağlam deride depolanmış interselüler antikorlar saptanabilir (67). Bu antikorlar genellikle IgG tipindedir ve olguların çoğunda C3 depolanması da eşlik eder. Antikorlar IgM ve IgA tipinde de olabilirler (66). Bu interselüler antikorların patojenik olduğunu gösteren birçok klinik ve deneysel kanıt mevcuttur. Bunlar; antikorların insan deri kültüründe akantolize yol açması (14), hasta serumu ile pemfigus vulgaris IgG'sinin neonatal fare modeline pasif transferinin pemfigusun tipik klinik ve histopatolojik lezyonlarına neden olması (68), aktif PV'si olan annelerin bebeklerinde, başlıca IgG4 subtipinde olmak üzere, antikorların plasental geçişle pemfigusun klinik, histopatolojik ve immünolojik

özelliklerine sahip yenidoğanda geçici bül oluşumuna neden olması (69,70,71), pemfigus hastalarında plazmaferez yöntemi ile serumdan yüklü miktarda otoantikor uzaklaştırılmasının geçici klinik iyileşmeye neden olması, ritüksimab ve İVİG gibi antikor düzeyini düşüren tedavilerle kliniğin düzelmesi, hastalık aktivitesinin antikor düzeyi ile korelasyon göstermesi olarak sıralanabilir (72).

İnterselüler antikorlar keratinosit hücre yüzey antijenlerinden birçoğuna karşı olabilirler, aynı molekülde birden fazla epitopu hedef olabilir (73). Bunlardan en iyi tanımlananları kaderin gen ailesine ait kalsiyum bağımlı adezyon moleküllerinden Dsg1 ve Dsg3'tür (74,75,76). Dsg1 ve Dsg3 pemfigusun ana antijenleridir ve halen birçok klinik alt tipte otoantikorların temel hedefidir (40). Dsg1 epidermisin üst tabakalarında yoğun olarak bulunurken suprabazal tabakada gözlenmemektedir. Dsg3 ise epidermisin derin tabakalarında yoğun olarak bulunurken en üst tabakalarda gözlenmemektedir (77,78). PV'de antikorlar ağırlıklı olarak Dsg3 ve daha az olarak Dsg1'e karşı gelişirken, PF'de ana antijen Dsg1'dir (79). PV hastalarında ayrıca Dsg4 (80), desmokolün (Dsc) (81), desmoplakin ve keratinositlerdeki asetilkolin (82,83) ve alfa-9 asetilkolin reseptörlerine (84) karşı antikorlar da saptanmıştır. Keratinosit asetilkolin reseptörleri özellikle intraepitelyal Dsg ekspresyonunu düzenleyerek hücreler arası bağda önemli bir rol oynamaktadır, Dsg olmayan pemfigus antijeni olarak da düşünülebilir. Farklı antijenleri hedef alan farklı otoantikorların sinerjistik etkisi, farklı hastalardaki hastalığın klinik ve biyolojik çeşitliliğini açıklayabilir (Çoklu darbe hipotezi) (Şekil 2.2) (40).

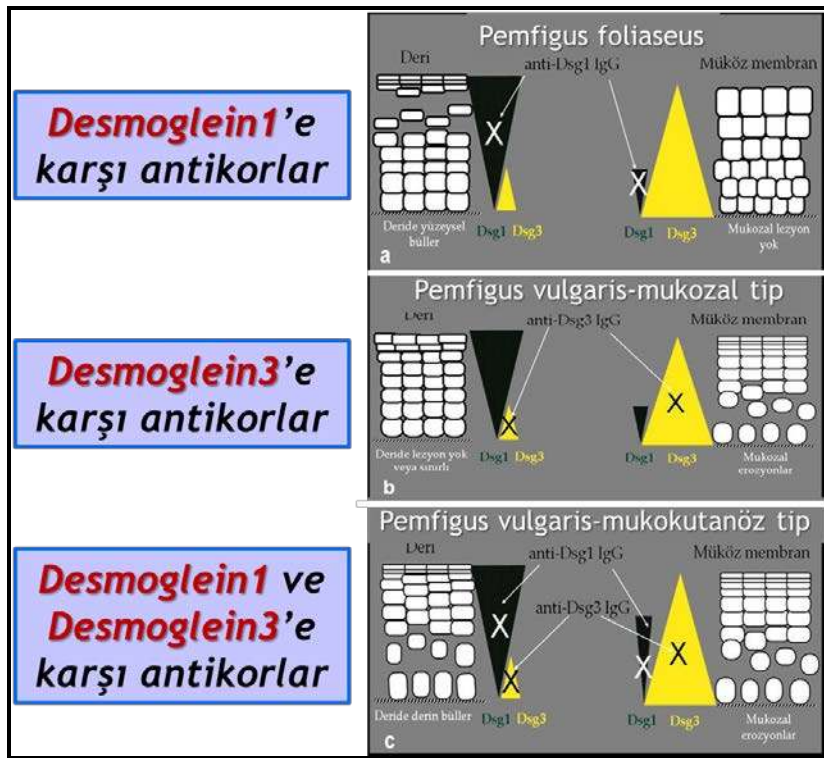


Şekil 2.2. Pemfigus otoantijenleri (85).

Dsg3 antijeni ekstraselüler 5 farklı kısımdan (EC1-5) oluşmaktadır. Özellikle EC2'ye karşı oluşmuş IgG4 antikorlarının akantolizi indüklediği bildirilmiştir. Otoantikorların nasıl akantolize neden olduğu bilinmemektedir. Bu konuda farklı hipotezler öne sürülmüştür. Bunların içinde günümüzde en çok kabul gören kompensasyon teorisidir. Dsg1 ve Dsg3'ün intraepidermal ekspresyon paterni deri ve müköz membranlarda farklılık gösterir. Bilindiği üzere Dsg3 ekspresyonu mukozalarda tüm epitel boyunca özellikle üst 2/3'de gözlenirken, deride sadece bazal tabakada ve bazal tabakanın hemen üzerinde gözlenmektedir. Dsg1 ise deride ve mukozada tüm epitel boyunca, daha yoğun olarak subkorneal tabakada eksprese edilmektedir (Şekil 2.3). Kompensasyon teorisine göre aynı hücrede birlikte eksprese edilen Dsg1 ve Dsg3 birbirinin adesif fonksiyonunu kompanse eder. Bu teori pemfigusta bül oluşumunun lokalizasyonunu en iyi açıklayan teoridir. Buna göre PF'de anti-Dsg1 IgG antikorlarının epidermisin üst tabakasında bül oluşturmalarının nedeni, epidermisin alt tabakalarında ve/veya mukozada Dsg3 ekspresyonun antikorlara bağlı Dsg1 fonksiyonundaki kaybı kompanse etmesidir. Benzer şekilde mukozal PV'de anti-Dsg3 otoantikorları mukozal epitelin en alt tabakasında akantolize neden olmaktadır, çünkü bu alanda Dsg1 ekspresyonu minimaldir. Derideki yüksek Dsg1 ekspresyonu ise bütünlüğü sağlar, deride bül oluşumu gözlenmez ya da sınırlı bir tutulum olur (86,87,88). Hem anti-Dsg1 hem de anti-Dsg3 otoantikorlarının gözlemlendiği mukokutanöz PV'de ise ayrışmanın neden bazal tabakanın hemen üzerinde meydana geldiği konusu açık değildir. Bu teoriyi desteklemek için farklı görüşler öne sürülmüştür. Bunlar, bazal tabaka ve bazal tabakanın hemen üzerinde daha az sayıda desmozom bulunduğundan hücreler arası bağın burada daha zayıf olabileceği ya da dermisten epidermise penetre olan antikorların alt tabakalara daha iyi nüfus ediyor olabileceğidir (1,86). Yeni doğan epidermisinde ise Dsg3 dağılımı yetişkin derisinden farklıdır ve müköz membrandaki dağılıma benzer. Dsg3 tüm epidermis boyunca keratinositler yüzeyinde eksprese edilir (1).

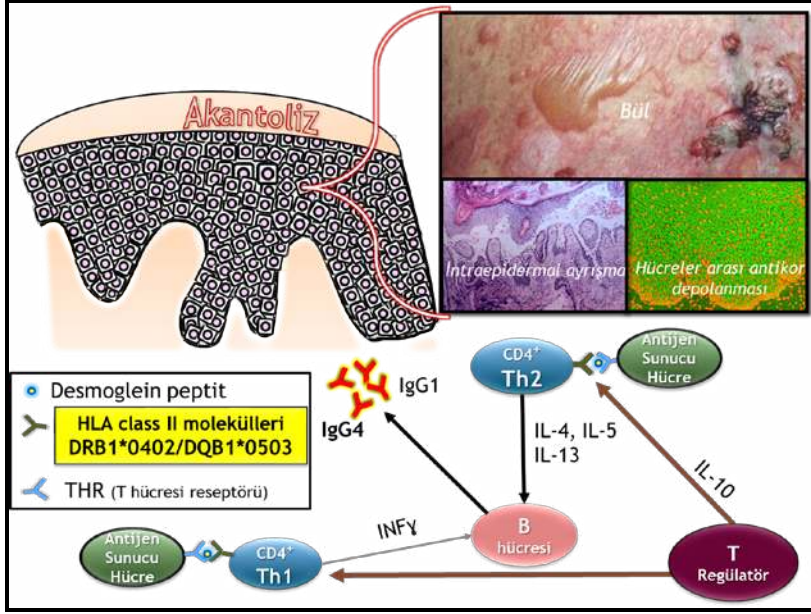
Akantolizi açıklamak üzere öne sürülen bir diğer hipotez plazminojen aktivasyon hipotezidir. Bu hipoteze göre PV-IgG'si sinyal iletimini anormal şekilde uyarır ve Dsg3'de fosforilasyona ve Dsg3'ün plakoglobinden ayrılmasına neden olur. Bu durum desmozomal yapının hücre içinden bozulmasına neden olabilir. PV-IgG'si aynı zamanda protein kinaz C (PKC) ileti yolağını da uyarır. Böylece ürokinaz tip plazminojen aktivatör (uPA) sekresyonu ve hücre yüzeyinde uPA reseptörü ekspresyonu olur. Sonuç olarak plazmin aktive olur. Bu uyarı hücre yüzeyinde önceden bulunan desmozomların

ayrılmasına olanak sağlayabilir. Bu iki farklı PV-IgG ile aktive ileti yolağı PV’de akantoliz oluşum mekanizmasından sorumlu olabilirler (86). Bunların dışında otoantikorların, Dsg üzerindeki adezyon alanlarını fiziksel olarak engelleyerek (yapısal engelleme hipotezi) (89) veya kompleks yapısal veya işlevsel bozukluklara yol açarak akantoliz oluşumuna yol açabileceği öne sürülmüştür. Bir diğer olasılık proteolitik enzimlerin salınımını uyarması olabilir (12). Bazı yazarlara göre ise otoantikorlar, keratinosit iskelet yapısını değiştirecek sinyalleri tetikleyerek keratinositlerde büzüşmeye, birbirinden uzaklaşmaya ve keratinositler arası bağlantının kopmasına neden olmaktadır (apoptolizis teorisi) (90,91).



Şekil 2.3. Pemfigusta akantoliz oluşumuna ilişkin hipotez (kompansasyon teorisi) (Prof. Dr. Masayuki Amagai'nin izni ile kullanılmıştır).

Bu patojenik interselüler otoantikorların nasıl oluştuğu ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Çoğu bireyde hastalık idiopatik olarak ortaya çıkarken bazı hastalarda ilaç gibi dış etmenlerin tetiklemesi ile oluşmaktadır (92). Farklı ilaçların farklı pemfigus formlarına neden olabileceği bildirilmiştir (93). Otoantikor oluşumunda T hücre cevabının rolü ve Dsg1 ve Dsg3 epitoplarına karşı spesifik T hücre cevabının olabileceği de öne sürülmüştür (Şekil 2.4) (94,95,96).



Şekil 2.4. Pemfigus patogenezinde T ve B hücrelerinin rolü.

Poliklonal olan antikor üretimi aktif hastalıkta sıklıkla IgG4 subtipinde iken remisyondaki hastalarda daha çok IgG2 subtipindedir (97). Kricheli ve ark.'ları çalışmalarında Dsg3 antijenine karşı oluşan IgG1 alt tipti antikorları PV hastası ve bu hastaların sağlam akrabalarında benzer sıklıkta, IgG4 alt tipi antikorları ise hemen her zaman sadece aktif hastalığa sahip bireylerde saptanmışlardır (98). Hastalık aktivitesi ile serum Dsg3 reaktif IgG4 düzeyi koreledir. Benzer şekilde Dsg1 antijenine karşı oluşan IgG4 subtipi antikorlar aktif hastalığı olan bireylerde daha yüksek konsantrasyonlarda saptanmıştır (99). Akut başlangıçlı ve aktif PV'li hastalarda IgG4 yanında Dsg3 reaktif IgE antikorlarının da bulunduğu, IgE serum düzeylerinin akut başlangıç ile korele olduğu bildirilmiştir (100).

Paraneoplastik otoimmün multiorgan sendromu (PAMS) olarak da adlandırılan PNP'de baskın antikor IgG1 subtipi antiplakin antikorlardır. Saptanan antijenler ise Dsg1, Dsg3, desmoplakin1-2, evoplakin, periplakin, plektin, 230 kDa BP antijenleri ve 170 kDa ağırlığında bilinmeyen bir proteindir (101,102,103,104,105). Plakin ailesi proteinler sitoplasmik proteinler olup, sağlam hücrede antikorlardan korunmuştur. Anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 otoantikorların keratinosit hücre zarında hasara yol açarak plakin ailesi proteinlerine karşı otoantikor oluşumunu uyarabileceği ve PNP patogenezinde primer role sahip olabileceği düşünülmektedir (104). Patomekanizmada tümör antijenleri ile çapraz immün reaksiyon olasılığı da düşünülmektedir.

IgA pemfigusunda otoantikorlar IgA tipindedir. Subkorneal püstüler dermatoz (SPD) benzeri tipte hedef antijen Dsc1 iken intraepidermal nötrofilik (İEN) tipte hedef antijen tam olarak belirlenememiştir. Bazı hastalarda Dsg1 ve Dsg3'e karşı da gelişmiş IgA antikorları saptanmıştır (106,107).

Pemfigus hastalarının çoğunda hastalığı tetikleyen bir faktör gözlenmezken yani hastalık kendiliğinde başlarken (idiopatik pemfigus), birçok hastada ayrıntılı bir klinik hikayede olayı başlatıcı bir faktörün varlığı saptanmaktadır (oluşturulmuş-induced veya tetiklenmiş-triggered pemfigus). Oluşturulmuş pemfigus, ekzojen faktörlerin (sıklıkla thiol grubu ilaçlar) lezyonların ortaya çıkmasında büyük rol oynadığı, tetikleyici faktör elimine edildiğinde tedavi verilme dahi lezyonların gerilediği, kliniği PF veya PH'ye benzeyen klinik durumdur. Bazı yazarlara göre tiyol ile oluşturulmuş pemfigus, gerçek pemfigusun karakteristik özelliklerinden çok azına sahip olabilir, bu nedenle pemfigus benzeri sendrom teriminin kullanılması daha uygundur (40). Tetiklenmiş pemfigusta ise endojen predispozan faktörler o kadar baskındır ki hastalığı indükleyen faktörler yalnızca hastalığı kolaylaştırır veya başlatır. Bu olgularda hızlandırıcı faktörler elimine edilse bile hastalık kendini devam ettirmektedir. Hastalık kendiliğinden oluşan pemfigusun, özellikle de PV'in karakteristik özelliklerini taşımaktadır (108). İlaçların sadece oral yolla alımı değil rektal, vajinal, göz, kulak ve nazal yolla uygulanmaları da hastalığa neden olabilmektedir (109). Topikal kullanımların da pemfigusa neden olabileceği bildirilmiş ve 'kontakt pemfigus' terimi kullanılmıştır (110, 111).

Genetik olarak yatkın bireylerde birçok endojen (emosyonel stres vb.) ve egzojen (ilaçlar, kontakt allerjenler, diyet, viral enfeksiyonlar, iyonize radyasyon, UV ışınları vb.) faktör PV oluşumunu kolaylaştırmaktadır (112). PV sıklığının ani artış göstermesinin en yaygın nedeni ilaçlardır. Başta fenol ve tiyol grubu ilaçlar olmak üzere birçok ilacın pemfigusu tetiklediği bildirilmiştir (Çizelge 2.3). Viral enfeksiyonlardan ise herpes virüs enfeksiyonunun pemfigus patogenezindeki yeri tartışmalıdır. Güneş yanığı, iyonize radyasyon, termal ve elektrik yanıkları, cerrahi işlemler ve hatta kozmetik uygulamaların bile yatkın bireylerde pemfigusu tetikleyebileceği yönünde birçok yayın mevcuttur (40). 1,3-dikloropropene bağlı alerjik kontakt dermatit sonrası PV oluşumu da bildirilmiştir (111). Sigara içicilerinde hastalığın daha az olması nikotin kolinerjik etkisi ile ilişkilendirilmiştir (113). Pemfigus etiopatogenezinde diyetin etkisine baktığımızda, uzun yıllardır Rusyalı Yahudilerde hastalığın insidansının yüksek olması, bu etnik grubun yeme alışkanlığında baharatların baskın olması ile ilişkilendirilmiştir.

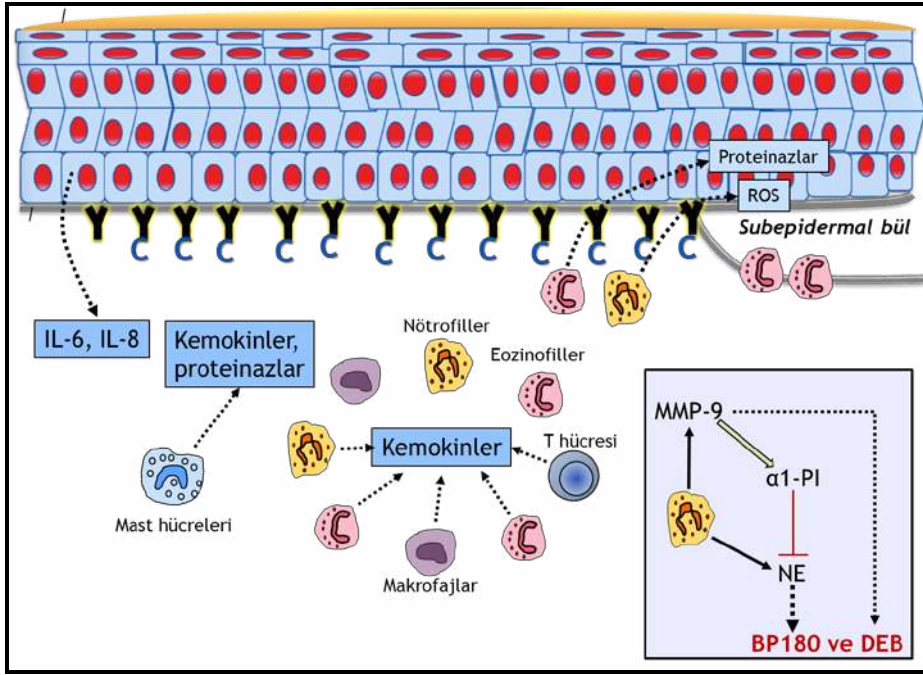
Sarımsak, soğan gibi *Allium* sınıfına ait bitkilerin fazla tüketimi ile birçok PV olgusu ilişkilendirilmiştir (112). Bu bitkiler tiyol içeriği olarak zengindir, in vitro ortamda tiyolün akantolitik potansiyeli gösterilmiştir (109,114). Benzer şekilde bitki ve meyvelerde bulunan tanninlerin de in vitro ortamda immünolojik olarak reaktif olduğu ve akantolize neden olabildiği gösterilmiştir (115,116). Tannin ve polifenolik birleşik içeren karabiber, kiraz, çoban üzümü (cranberry), böğürtlen ve çay gibi meyve ve sebzelerin yatkın bireylerde PV'in başlangıcını kolaylaştırdığından şüphelenilmektedir. PV'in tetiklenmesine neden olan bir diğer faktör de emosyonel streştir, pek çok olgu bildirilmiştir (40).

Çizelge 2.3. Pemfigus gelişimine neden olan veya tetikleyen ilaçlar (40).

Tiyoller	Fenoller	Tiyol ve fenol olmayanlar
• Penisilamin • Kaptopril • Penisilin ve türevleri • Sefalosporinler • Piroksikan • Tiamazol • Altın tuzu	• Sefalosporinler • Aspirin • Rifampin • Levodopa • Heroin • Pentaklorofenol • Fenobarbital	• Kaptopril dışındaki ACE inhibitörleri • NSAİİ'lerin çoğu • Nifedipin • Aşılar, interferon ve diğer sitokinler • Diğerleri

2.3.2. BP etyopatogenezi

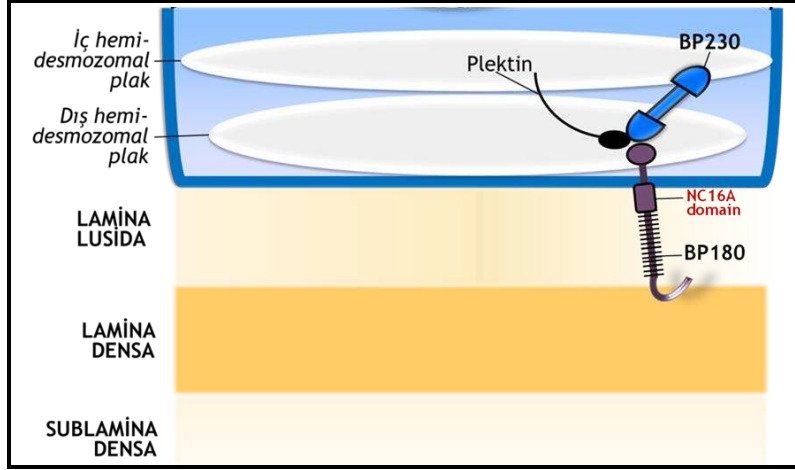
BP'de otoantikörler hemidesmozomdaki BP230 (BPAg1) ve BP180 (BPAg2, kollajen XVII) antijenlerine karşı oluşmuştur (2,117,118). BP180 tip II transmembran protein iken BP230 sitoplazmik bir proteindir. Antikorların bazal membrana bağlanması kompleman ve inflamatuvar mediyatörleri aktive eder. Subepidermal büllöz hastalıklarda otoantikörler inflamatuvar süreci aktive ederek bül oluşumunu tetiklerler (Şekil 2.5) (119, 120, 121, 122).



Şekil 2.5. BP fizyopatolojisi (123).

Başlangıçta BP230, BP'nin ana antijeni olarak tanımlanmıştır; ancak günümüzde BP180 ana patojenik antijen olarak kabul edilmektedir. Hastaların %80'inden fazlasında ELİSA ve immüno blotting ile BP230 antijenine spesifik otoantikor saptanır. BP230'un C-terminali hedef otoantijendir. BP180 proteininin değişik parçaları kullanılarak yapılan epitop haritalandırılmasında ise BP hastalarının çoğunun serumunun NC16A'yı tanıdığı gösterilmiştir (Şekil 2.6) (124). Yapılan çalışmalarda BP'li hasta serumlarının %94-96'sının BP180 NC16A peptidi ile reaksiyona girdiği saptanmıştır. Serum BP180 NC16A otoantikor düzeylerinin hastalık aktivitesi ile korele olduğu da gösterilmiştir; bu BP180 otoantikorlarının patojenik olduğunu gösteren bir bulgudur. Oluşan otoantikorlar IgE, IgG1 ve IgG4 alt tipindedir (121). BP180'e karşı oluşan otoantikorların patojenik olduğunu destekleyen birçok kanıt mevcuttur. Bunlar; neonatal fare ve hamsterlere BP180 antikorları pasif transfer edildiğinde subepidermal bül oluşması (120), BP hastalarında BP180 otoantikorlarının DEB'e lökositleri çekmesi, toplaması ve insan deri kesitlerinde DEB'de ayrışmaya neden olmasıdır (125). Patogeneizde IgE otoantikorlarının da önemli rol oynadığı düşünülmektedir, hem BP180 hem de BP230 antijenlerine karşı oluşan IgE otoantikorları saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda tedavi almayan BP'li olguların %70'inde total IgE düzeyleri yüksek bulunmuştur ve bu olguların %86'sında BP180'e karşı gelişmiş IgE otoantikorları saptanmıştır. Yüksek anti-BP180 IgE otoantikorlarının düzeyi hastalık

şiddeti ile ilişkili bulunmuştur (126,127,128). Bu bilgiler ışığında BP tedavisinde omalizumab kullanımı gündeme gelmiştir. BP180 antijenine karşı gelişen IgA otoantikorları da bildirilmiştir (129,130). Bazı çalışmalardan elde edilen veriler ise hastalığın T hücre bağımlı otoimmün bir hastalık olduğunu düşündürmektedir (131,132). Hastalığın patogenezinde özellikle Th2 sitokinleri önemlidir (2). Yine son yıllarda BP180 NC16A epitopuna spesifik olan hafıza B hücreleri de tanımlanmıştır (133).



Şekil 2.6. BP otoantijenleri.

Hastalığın başlamasında travma, yanık, radyoterapi, ultraviyole ışınlar (UVB, PUVA), cerrahi işlemler ve en sık influenza aşısı olmak üzere aşılar tetikleyici faktörler olarak suçlanmaktadır (134,135,136). Genetik olarak yatkın bireylerde etiyopatogenezinde suçlanan ilaçlar ise diüretikler (furosemid), analjezikler (ibuprofen), D-penisilamin, antibiyotikler ve kaptoprildir (136,137). Yapılan iki çalışmada spirinolakton ve fenotiyazin kullanımının BP için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (138,139). İlaçlar hem sistemik hem de topikal kullanım ile hastalığı tetikleyebilmektedirler (140). Deneysel araştırmalar enfeksiyonların olası rolü hakkında ip uçları vermektedir (136). Tetikleyici faktörler arasında diyet yer almamakla birlikte diyetteki nikel ile uyarılan bir olguda, diyetten nikelin çıkarılması sonucu tam iyileşme bildirilmiştir (141).

2.4. Klinik

2.4.1. Pemfigus kliniği

Mukokutanöz tutulum görülen pemfigus hastalığında deri lezyonlarının dağılımı ile hastalık oluşumunda rol oynayan otoantikorların hedef aldığı antijenlerin dağılımı arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Pemfigus lezyonları sıklıkla antijen yoğunluğunun fazla olduğu saçlı deri, yüz ve üst gövdede bulunurken, antijen yoğunluğu düşük olan bacaklarda nadiren görülür (142). Lezyonların dağılımı aynı zamanda antikor profiline göre de farklılıklar gösterir. Sadece Dsg3'e karşı otoantikor oluşturan hastalarda oral lezyonlar sıkken, hem Dsg1 hem de Dsg3'e karşı otoantikora sahip olan hastalarda kutanöz ve oral lezyonlar, sadece Dsg1'e karşı otoantikor oluşturan hastalarda ise oral lezyon olmaksızın sadece deri lezyonları görülür (40,87). Pemfigus hastalığında en önemli sübjektif yakınım yanma ve kaşıntıdır. Kilo kaybı, ateş, halsizlik, huzursuzluk, anoreksiya eşlik edebilecek diğer semptomlardır (45).

a) PV

PV genellikle ağızda ağırlı iyileşmeyen ülserlerle başlar (143). Ülserler sağlıklı görünümlü mukozadan gelişir; genellikle çok sayıda, yüzeysel ve düzensiz şekillidir. Oral mukoza en sık tutulan bölgedir, hastaların yaklaşık üçte ikisinde hastalık oral mukozadan başlar (40,144,145). Erozyon ve ülserlerin kenarında bül artıkları görülebilir ancak sağlam bül görülmesi nadirdir. En sık bukkal ve labial mukoza tutulur. Bunun dışında yumuşak ve sert damak, ağız tabanı, gingiva tutulumu da gözlenir, dil tutulumu daha nadirdir. Genellikle ilk muayenede tanı konulamaz. Lezyonlar haftalar aylarca iyileşmediği; antibiyotik, antifungal ve antiviral tedavilere yanıt alınamadığı zaman akla gelir. Ağızda bir aydan fazla süren iyileşmeyen çok sayıda ülseri olan hastalarda pemfigus düşünülmelidir (12,146). Yapılan çalışmalarda %7-24 arasında değişen oranlarda hastalığın erozif deskuamatif gingivostomatit şeklinde oral mukozaya sınırlı kalabileceği bildirilmiştir (24,143,144). Hastalığın seyrinde oral mukozada başlayan lezyonlar 4-8 ay arasında deride de gözlenmeye başlar; sıklıkla saçlı deri, yüz ve gövdenin üst yarısında gözlenir. Nadiren deri lezyonları başlangıç bulguları olabilir. Deri lezyonları genellikle içi saydam küçük büller şeklinde başlar. Büller gevşektir ve birkaç günde rüptüre olurlar, yüzeysel keskin sınırlı erozyonlar oluşur. Lezyonlar genellikle normal görünümlü deride saçlı deri, göğüs ve sırtta oluşur, gövdedeki lezyonlar orta hatta yerleşmeye eğilimlidir (12,147). Diğer sık tutulan alanlar yüz ve boyundur. Muayenede umblikal ve periungual tutulum da değerlendirilmelidir. Paronişi hastalığın

ilk bulgusu (148, 149) veya alevlenme belirtisi olabilmektedir (150,151). Palmoplantar büllerin varlığı ise şiddetli hastalığa işaret eder. Tırnak tutulumu en sık akut ve kronik paronişi olarak karşımıza çıkar ve hastaların %51,9'unda görülür (150). Periungual tutulum nadiren onikomadez, onikoşiz, onikoliz, Beau çizgisi gibi çeşitli tırnak anormalliklerine neden olabilir (148,150). Hastalarda nazal kavite, farenks, larenks ve özefagus mukozalarının tutulumu nazal konjesyon, epistaksis, ses kısıklığı, disfaji ve odinofajiye neden olabilir. Yapılan çalışmalarda hastaların %49'unda laringeal veya nazal veya her ikisine ait semptomlar saptanmıştır (152). Kandidiazis ile benzer semptomlar gözleendiğinden bu hastalara kulak burun boğaz muayenesi yapılmalıdır (12). Bunun dışında konjunktiva, üretra, rektum ve genital mukozada da erozyon ve ülserler görülebilir. Çok katlı yassı epitel ile örtülü her yer hastalıktan etkilenebilir (40).

PVE, PV'nin daha iyi prognozlu, nadir görülen klinik bir varyantıdır. Neumann ve Hallopeau olmak üzere iki klinik formu vardır. Neumann tipinde klinik olarak lezyonlar PV gibi başlayıp sonrasında vejetatif lezyonlar gelişirken, Hallopeau tipinde daha çok püstüller izlenmektedir. Tipik olarak aksilla, inguinal bölge ve meme altı gibi kıvrım bölgelerine lokalize gevşek bül ve püstüller vejetatif plaklara dönüşerek iyileşirler. Neumann tipi daha şiddetli bir klinik seyir gösterirken Hallopeau tipi lokalize kalma eğilimindedir (10).

b) PF

PF'de klinik olarak sağlam bül görmek mümkün değildir. Skuamlı kurutlu lezyonlar yüz, saçlı deri, presternal ve interskapüler alan gibi seboreik alanlara sınırlı kalma eğilimindedir. Kurutlar kolay kaldırılır ve tabanındaki yüzeysel erozyonlar ortaya çıkar. Tipik olarak mukozal tutulum gözlenmez. Hastalık ilerleyerek eksofoliyatif eritrodermiye neden olabilir. Pemfigus eritematozus (PE) (Senear-Usher pemfigus) ve endemik pemfigus (Fago selvagam) klinik varyantlarıdır. PE, lupus eritematozusun klinik ve immünolojik özelliklerinden bazılarını sergiler. Hastalık yüze yerleşir; klinik olarak yüzde sıklıkla kelebek biçiminde skuamlı, kurutlu eritem ile karakterizedir. PE ve lupus birlikteliği az sayıda bildirilmiştir (147).

c) IgA pemfigusu

IgA pemfigusu keratinosit yüzey antijenlerine karşı gelişmiş IgA tipi otoantikörlerin varlığı ile karakterizedir. SPD benzeri ve İEN tip olmak üzere iki alt formu tanımlanmıştır. Klinik olarak eritemli veya normal deride vezikülopüstüller lezyonlar ile karakterizedir. Lezyonlar birleşme eğilimindedir, anüler ve sirsine dizilim

gösterirler. Kenarı belirgin anüler infiltrate plakların ortası kurutuludur. Gövdenin alt yarısı, alt ekstremitte proksimali ve intertrijinöz alanlara yerleşme eğilimindedir (1,10,153). Mukozal tutulum gözlenmez. 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 (51).

d) İlaça bağlı pemfigus

İlaça bağlı pemfigusun klinik, histopatolojik (154) ve immunfloresan (155) özellikleri idyopatik pemfigus ile aynıdır. Pemfigus aktivasyonu ilk kez 1950'lerin başında penisilamin kullanımı ile bildirilmiştir (32). Pemfigusu başlatan veya alevlendiren ilaçların başında penisilamin, kaptopril, busilamin ve tiyopronin gelir (Bkz. Çizelge 2.3). Her ne kadar nadir görülen bir durum olsa da yeni tanı pemfigus hastalarının hepsinde bu olasılık dışlanmalıdır (92). Neden olan ilacın kesilmesi ile tiyol grubu ilaçlara bağlı pemfigusta %40-50, tiyol grubu dışındaki ilaçlara bağlı pemfigusta ise %15 oranında spontan remisyon gözlenmiştir (153,156).

e) PH

PH'de klinik bulgular dermatitis herpetiformis, immünolojik bulgular pemfigus özelliklerine sahiptir. Sıklıkla PF varyantı ile uyumlu iken PV varyantı ile uyumlu bazı olgular bildirilmiştir. Lezyonlar kaşıntılıdır, herpetiform paternli vezikül ve büllere urtika plakları da eşlik edebilir (31).

f) PNP

PNP'nin kliniği ise oldukça değişkendir. Epitel ve iç organları hedef alan, çoklu organ tutulumu ile giden otoimmün bir sendrom olarak değerlendirilmektedir. Sıklıkla şiddetli, ağrılı, tedaviye dirençli oral lezyonlar ile başlar ve dudakların hemorajik kurutlu erozyon ve ülserleri tipiktir. Hastaların %45'inde oral mukoza tutulumu ilk bulgudur (157). Diğer mukoza tutulumları pemfigusun diğer formlarından daha sık görülür (103). Göz tutulumu sıktır ve akut dönemde genellikle sikatrissiyel pemfigoid kadar şiddetlidir. Klasik pemfigusta bronşial ve alveolar hava yollarında tutulum gözlenmezken paraneoplastik pemfigusta neredeyse hastaların tümünde pulmoner tutulum gözlenir ve sıklıkla ölümle sonuçlanacak kadar şiddetlidir (bronşiolitis obliterans) (102,158). Deri lezyonları polimorfiktir; gevşek bül, erozyon, eritemli papüller, hedef tahtası benzeri lezyonlar, likenifiye ve eritemli plaklar görülebilir. İnflame makül, papül ve plaklar her zaman gözlenir ve büllerden daha baskın klinik bulgu olarak karşımıza çıkabilir. Büller pemfigusun aksine inflame eritemli zemin üzerinden gelişir (102). Genel görüş

akantoliz, Dsg1 ve Dsg3 antijenlerine karşı oluşan antikorlar ile pemfigusun bir alt tipi olduğudur. Ancak bazı yazarlara göre sıklıkla ilişkili olduğu altta yatan lenfoproliferatif hastalık ile ayrı bir antite olduğu yönündedir (12). Pemfigustan çeşitli klinik, histolojik ve immünfloresan özelliklerle ayrılır. Deri lezyonları sıklıkla eritema multiforme ve toksik epidermal nekrolize benzer, BP, liken planus, liken planus pemfigoides, hatta kronik GVHD'ye benzer vakalar da bildirilmiştir (102). Hastaların %84'ü non-Hodgking lenfoma, kronik lenfositik lösemi ve Castleman hastalığı gibi hematolojik neoplaziler ile ilişkili bulunmuştur. İlişkili olduğu hematolojik kökenli olamayan tümörlerin çoğu ise epitel kökenli karsinomlardır (157,159). Eşlik eden neoplaziler mukokutanöz bulgulardan önce veya sonra gelişebileceği gibi en sık birlikte tanı konulur (102). PNP şüpesi olan olgularda toraks, abdomen ve pelvisin bilgisayarlı tomografi ile değerlendirilmesi önerilmektedir (18). 1993 yılında hastalığın tanısı için majör ve minör kriterler oluşturulmuştur. Majör kriterler; polimorfik mukokutanöz erupsiyon, eşlik eden internal neoplazi, spesifik immünopresipitasyon paterninde serum antikorları iken minör kriterler; akantolizin histolojik olarak gösterilmesi, bazal membranda ve epidermiste interselüler aralıkta direkt immünfloresan pozitifliği ve sıçan mesanesi epitelinde İİF pozitifliğidir. Üç majör veya iki majör ve iki minör kriter tanı için yeterlidir (160).

2.4.2. BP kliniği

Hastalık tipik olarak yalnızca kaşıntı veya kaşıntılı papüller veya ürtikeryal lezyonlar şeklinde prodromal faz (bülsüz faz) ile başlayabilir, haftalar hatta aylar sonra bül oluşumu (büllü faz) gözlenebilir (161,162). Büller gergin, saydam ve büyüktür, normal deri veya eritemli alan üzerinden gelişebilir. Nikolsky belirtisi negatiftir. Günlerce sebat edebilir ve yerini erode, kurutlu lezyonlara bırakır. Lezyonlar gövde ve proksimal ekstremitelerde, simetrik dağılım gösterir (153,163). Koltuk altı, kasık, dirsek iç yüzü gibi fleksural tutulum eğilimi vardır (60). Oral mukoza tutulumu hastaların %10 ila %30'unda bildirilmiştir, diğer mukozaların tutulumu oldukça nadirdir (164,165). Lezyonlar tüm vücuda yayılabileceği gibi nadiren lokalize de kalabilir. Lokalize BP sıklıkla pretibial alanı etkiler; paralizisi olmuş ekstremiteye, cerrahi insizyon alanına, palmoplantar, umbilikal ve vulvar alana sınırlı olgular da bildirilmiştir (19).

2.5. Tanı

Yukarıda sayılan klinik özellikler bu grup hastalıklardan şüphelenmekte önemli yol gösterici bulgulardır. OBH'nın tanısı klinik özellikler, histopatolojik ve immünolojik bulgular ile konur (1,2,12,161). Bu grup hastalıklarda altın standart otoantikorların gösterilmesidir. Bu amaca yönelik metodlar; DİF, İİF, ELİSA, immünopresipitasyon ve immünoblottingdir.

2.5.1. Sitoloji

Sitolojik inceleme ucuz, hızlı, görece ağrısız ve tekrarlanabilir olması nedeni ile birçok avantaja sahiptir. OBH'da sitoloji pemfigusun pemfigoid gurubu hastalıklardan ayırt edilmesinde, yeni atakların saptanmasında ve ikincil enfeksiyonların tespiti amacıyla kullanılır (166).

a) Pemfigus sitolojisi

Pemfigusta Tzanck sitolojisinde akantolitik hücre pozitifliği %93,3 ile %100 arasında bildirilmiştir (167,168). Tipik akantolitik hücrelerle birlikte pemfigus hastalarında Sertoli'nin rozet formasyonu ve streptositler de gözlenebilir (166, 169). Tzanck sitolojisi DİF ile de kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada tüm pemfigus hastalarında akantolitik keratinositlerin etrafında tipik IgG depositleri gözlenmiştir (170). Sitolojik olarak akantolitik hücreler tek veya küme yapmış, yuvarlak veya oval şekilli, dar bazofilik sitoplazmaya sahip, nükleus/sitoplazma oranı nükleus lehine bozulmuş hücrelerdir. Hücre sitoplazması nükleus çevresinde daha soluk (perinükleer halo), periferde ise daha koyu (kederli kenar) boyanır. Özellikle kronik lezyonlardan yayma yapıldığında akantolitik hücreyi fagosite etmiş çok çekirdekli dev hücreler görülebilir (171).

b) BP sitolojisi

BP'de ise Tzanck sitolojisinde akantolitik hücreler görülmez, keratinositler az sayıda gözlenir, bol lökosit ve eozinofil mevcuttur (166).

2.5.2. Histopatoloji

OBH'dan şüphelenildiğinde biyopsi yeni oluşan vezikülün kenarından normal deriyi de içerecek ve epidermis dermisten ayrılmayacak şekilde alınmalıdır. Oral mukozada biyopsi için erode alanın kenarı tercih edilmelidir.

a) Pemfigusta histopatoloji

Tüm pemfigus formlarında temel patoloji keratinositlerin birbirleri ile bağlantılarını kaybetmeleri sonucu oluşan akantolizdir. Akantolitik hücreler histopatolojik olarak yuvarlak şekilli, bazofilik, nükleus/sitoplazma oranı artmış dar sitoplazmalı ve büyük nükleuslu, periferde yoğunlaşmış keratin ve belirgin nükleollere sahip hücrelerdir (172). Histolojik olarak akantolizin eşlik ettiği intraepidermal büller PV ve PVE’de bazal tabakanın hemen üzerinde (suprabazal), PF ve PE’de stratum korneumun hemen altında (subkorneal) yer alır. Akantoliz bül alanı içinde ve çevresinde yaygın olarak izlenir, ayrıca kıl folikül epitelini de etkileyebilir. PV’de suprabazal ayrışma ile kolumnar yapıdaki bazal keratinositler tek sıra halinde bülün taban kısmında, dermal papillanın üzerinde izlenebilirler. Bu görüntü ‘sıralanmış mezar taşları’ veya ‘mezar taşı sırası’ olarak adlandırılmaktadır (106,173). PV sıklıkla oral mukozadan başladığı ve/veya oral mukozaya sınırlı kaldığı için genellikle oral mukoza lezyonlarından biyopsi alınması gerekir, histopatolojik özellikler benzerdir.

PVE histopatolojik olarak PV’ye benzer ancak epidermal hiperplazi, hiperakantoz ve papillamatoz çok belirgindir, epidermal ayrılma PV kadar yaygın izlenmez.

PF’de bül subkorneal veya intragranüler yerleşimlidir, akantoliz granüler tabakada fokal olarak izlenir, diskaratotik granüler keratinositler temel histopatolojik bulgularındandır. PF’de eozinofilik spongiöz PV’ye göre daha sık gözlenir. PE’de PF’nin histopatolojik bulgularına bazı olgularda interface (arayüz) dermatiti de eklenebilir.

IgA pemfigusunda histopatolojik olarak; SPD benzeri tipinde subkorneal, İEN dermatoz tipinde intraepidermal püstül oluşumu gözlenir. Her iki durumda da akantoliz minimaldir.

PH’de de eozinofilik spongiöz sıklıkla gözlenir (31,172), intraepidermal bül çoğu olguda subkorneal yerleşimlidir, ancak nadiren suprabazal ve spinöz tabakada da yerleşim gösterebilir.

PNP’nin histopatolojisi klinik bulgularla uyum gösterir, değişkendir. En sık klasik pemfigus bulguları ile vakuoler/likenoid arayüz dermatiti bulgularının birlikteliği gözlenir (106,107,173).

b) BP’de histopatoloji

BP’de DEB’in ayrışması ile subepidermal büller gözlenir. Dermal papilla ödemlidir; lenfosit, makrofaj, nötrofil ve eozinofilleri içeren yüzeysel dermal

inflamasyon gözlenir. Tipik olarak eozinofiller hem bül kavitesi içinde, hem de dermisde yoğun olarak bulunurlar, eozinofilik spongioz gözlenir. Bu hücreden zengin patern dışında hücreden fakir, inflamasyonun az olduğu BP olguları da bildirilmiştir (107). Normal deri üzerinden gelişmiş büllelerden alınan biyopsi materyallerinde histopatolojik olarak hem bül içinde hem de dermisde az sayıda lenfosit ve eozinofil görülür. Bül oluşumunun gözlenmediği prodromal fazda alınan biyopsilerde ayrışma görülmeyebilir, eozinofilik spongioz veya üst dermiste DEB'de uzanan eozinofiller görülebilir (19, 174). Bu erken dönemde histopatolojik bulgular spesifik değildir. Son dönemlerdeki immünohistokimyasal çalışmalarda formol fikse dokuda DEB'de C3d depolanmasının saptanması BP tanısını destekleyici bulunmuştur (175).

2.5.3. Direkt immünfloresan

1960'lı yılların başında immünfloresan tekniklerle pemfigus ve BP otoantikörlerinin keşfi OBH'nın tanısında en önemli dönüm noktasıdır. Pemfigus ve BP tanısında DİF rutinde en yaygın kullanılan altın standart tanı yöntemidir (176,177). Özellikle oral pemfigus tanısında tüm tanı yöntemleri içerisinde en duyarlı yöntemdir (178). DİF için biyopsi taze bir lezyonun hemen yanındaki normal görünümlü deri veya mukozadan alınmalıdır. İnflame ve/veya bül alanından alınan örneklerde yalancı negatiflik gözlenmektedir (177). Son dönemlerde çekilen anajen kılın dış kök kılıfının da pemfigus tanısında DİF'de materyal olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (179,180,181).

a) Pemfigusta DİF bulguları

Pemfigusta karakteristik DİF bulgusu interselüler aralık (İSA) depolanmasıdır (balık ağı, tavuk kümesi görünümü). Aktif hastalığı olanlarda uygun biyopsi alındığında %90-100 arasında DİF pozitifliği bildirilmiştir (66,178). IgA pemfigusu dışında bütün pemfiguslarda İSA'da IgG depolanır. IgG'ye C3 depolanması da eşlik edebilir (182). DİF ile pemfigus grubu hastalıklar içerisinde alt tip tayini yapılamaz. Nadiren depolanma sınırlı olabilir veya bül oluşumunun gözleendiği seviyede daha yoğun olabilir, bu durumda alt epidermal tabakada depolanma PV ve üst epidermal tabaka depolanma PF lehine yorumlanabilir (183). İSA'da tek başına IgA depolanması ise IgA pemfigusuna işaret eder, tanısaldır (184). İSA ile birlikte bazal membran zonunda (BMZ) IgG depolanması ise iki durumda gözlenir; PE ve PNP. Bu iki durum birbirinden klinik ve histopatolojik bulgularla ayrılır. Pemfigus hastalarının %10'unda DİF yalancı

negatiftir. İlaça bağlı pemfigus hastalarının az bir kısmında DİF gerçekten negatif olabilir. Pemfigusta DİF'in pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri ise %85-90 arasındadır (177). Genellikle DİF, İİF'den daha önce pozitifleşir ve tanısal değeri İİF'ye göre daha yüksektir.

b) BP'de DİF bulguları

BP'de tipik olarak BMZ boyunca IgG ve/veya C3 lineer bant şeklinde depolanır. Nadiren bu bulguya ek olarak zayıf lineer IgA ve IgE depolanması da gözlenebilir (19,58,185). DİF pozitif olan hastalarda BMZ depolanması görülen diğer OBH'yı ekarte etmek için TAİD ile İİF test uygulanmalıdır. BP'yi diğer otoimmün subepidermal büllöz hastalıklardan ayırmada kullanılan diğer yöntemler ise BMZ'deki lineer floresan paterninin yakından analizi (BP'de 'n tipi' testere dışı paterni gözlenir) (186) ve FOAM (fluorescence overlay antigen mapping) tekniği ile alınan görüntülerdir. BP'de FOAM yöntemi ile yeşil boyanan lamina lucidadaki IgG birikimleri ile kırmızı boyanan tip VII kollajen bantları üst üste gelmemektedir (187).

2.5.4. İndirekt immünfloresan

İİF, hasta serumundaki antikorların belirli antijenler kullanarak saptanması esasına dayanır, tanıyı doğrulamak ve/veya büllöz hastalıklar arasında ayırıcı tanı yapmak amacıyla kullanılır. Bu amaçla farklı büllöz hastalıkların tanısında substrat olarak kullanılan antijenler insan derisi, maymun özefagusu, sıçan mesanesi ve TAİD'dir. Substratların sensitivitesi ve spesifitesi farklı büllöz hastalıklarda değişkenlik gösterir (177,185). Dsg3'den zengin maymun özefagusu PV'nin IgG otoantikorlarını göstermede en sensitif substrattır (185). Dsg1'den zengin Gine domuzu özefagusu ise PF tanısında tercih edilen substrattır (188). Birden fazla substrat kullanımı ile tanısal sensitivite artırılabilir. İnsan derisi ve maymun özefagusu birlikte kullanıldığında tanısal sensitivite %100 iken, bu substratlar tek tek kullanıldığında sensitivite sırasıyla %83 ve 90 olarak bildirilmiştir (14,189). Sensitivitesi en yüksek olanlar sırasıyla normal insan derisi, maymun özofagusu ve sıçan özefagusudur (190).

a) Pemfigusta İİF bulgular

Pemfigus hastalarının serumunda IgG otoantikorları İİF ile %80-90 olguda saptanmaktadır (190,191). PV, PF ve ilaca bağlı pemfigus hastalarında IgG İSA'da depolanırken PE ve PNP'de İSA ile birlikte BMZ'de de depolanma gözlenir. Benzer depolanma Kolombiya endemik pemfigusunda da tanımlanmıştır (31). Tüm pemfigus

tiplerinde otoantikörler sadece çok katlı yassı epitelde depolanırken PNP’de ek olarak kolumnar ve transizyonel hücreli epitelde de depolanma gözlenir. PNP tanısında en iyi tarama testi plakin zengin sıçan mesanesi epiteli ile İİF’dir, sensitivitesi %75 ve spesifitesi %83 olarak bildirilmiştir (192). İSA’da IgA depolanması IgA pemfigusu için karakteristiktir ve hastaların yaklaşık %50’sinde saptanır (193). Dolaşımdaki IgA otoantikörlerini saptamada deri kültürünün, standart insan derisi ve maymun özefagusu gibi substratlardan daha sensitif olabileceği bildirilmiştir (184).

Pemfigus benzeri antikörler yanık, penisiline bağlı ilaç erupsiyonu, deri grefti, BP ve mukozal pemfigoid ve toksik epidermal nekroliz hastalarında da bildirilmiştir. Bu hastalarda yalancı pozitiflik gözlenebilmektedir (177).

b) BP’de İİF bulgular

BP’de kanda dolaşan IgG otoantikörleri hastaların %60-90’ında İİF yöntemler ile saptanabilmektedir (194,195). Tercih edilen, en sensitif substrat TAİD’dir (196). Lamina lusina boyunca ayrıştırılmış insan derisinde lineer depolanma ayrışmanın epidermal veya hem epidermal hem de dermal tarafında saptanırsa bu öncelikle BP’yi işaret eder. BP’nin edinsel epidermolizis büllozadan, anti-epiligrin müköz membran pemfigoidinden ve anti-p200 pemfigoidinden ayrılması için bu test yapılmalıdır (Bkz. Çizelge 2.2). Hastadan alınan deri biyopsisinin 1.0 mol/L NaCl ile lamina lucida boyunca ayrıştırılması sonrası uygulanan DİF’de BP ile edinsel epidermolizis büllozayı ayırmada oldukça başarılı bulunmuştur (197).

2.5.5. ELİSA

İmmüno blotting ve immüno presipitasyon testlerde olduğu gibi kanda dolaşan otoantikörlerin spesifik olarak hangi antijenik yapılara karşı geliştiğini saptayan testlerden biridir. Klinik, histopatolojik ve immüno floresan yöntemlere ek olarak OBH’nın tanısında doğrulama testi olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ELİSA ticari test sistemlerinin geliştirilmesi ile bu spesifik antikörlerin titrasyonu hastalığın tanısı ve takibinde kullanılmaya başlanmıştır (198). Diğer geleneksel tanı yöntemlerine göre ELİSA daha hızlı, uygulanması kolay, daha iyi standardize edilebilir olması ve birçok örneğin aynı anda çalışılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Günümüzde ELİSA, büyük ölçüde immüno blotting ve immüno presipitasyon testlerinin yerini almıştır.

a) Pemfigus tanısında ELİSA

PV tanısında ELİSA'nın kanda dolaşan otoantikörleri saptamada en sensitif ve spesifik test olduğu düşünülmektedir (199,200). Özellikle, Dsg1 ve Dsg3'ün antijenik ektodomainlerinin aktarıldığı insan HEK293 hücrelerinin kullanıldığı yeni ELİSA testinin oldukça sensitif ve spesifik olduğu bildirilmiştir (201). Pemfigus tanısında farklı ticari ELİSA sistemlerinde testin sensitivitesinin hem anti-Dsg1 hem de anti-Dsg3 için %90'ın üzerinde, spesifitesinin %95'lerde olduğu bildirilmiştir (202,203,204). Tampon ve ark.'nın derlediği metaanalizde de anti-Dsg3'ün sensitivitesi %97 ve spesifitesi %98,5 bildirilmiştir (199). PV, Dsg3'e ve nadiren birlikte Dsg1'e karşı oluşan otoantikörler ile ilişkili iken PF, tek başına Dsg1'e karşı oluşan antikörler ile ilişkilidir (73,87). Deri lezyonlarının şiddeti anti-Dsg1 antikör düzeyi ve oral mukoza lezyonlarının şiddeti anti-Dsg3 antikör düzeyi ile ilişkili bulunmuştur (205,206,207). PV hastalarında hastalığın takibinde deri lezyonlarının seyri ile ELİSA anti-Dsg1 antikör değerleri arasında yakın korelasyon mevcutken, mukozal lezyonların seyri ile ELİSA anti-Dsg3 otoantikör değerleri arasında paralellik gösterilememiştir (208). Mukozal lezyonların şiddeti ile tükürük ELİSA anti-Dsg1 otoantikör değerleri arasında anlamlı ilişki bildirilmiştir (206).

PNP tanısında envoplakin rekombinant N-terminalini içeren ticari ELİSA testi kullanılmaktadır; sensitivitesi %82, spesivitesi %100 olarak bildirilmiştir (209).

Kanda dolaşan pemfigus otoantikörleri yanık hastalarında, alerjik ilaç reaksiyonlarında, fungal enfeksiyonlarda ve ABO kan grubu antijenlerine karşı antikör geliştiren hastalarda düşük titrelerde saptanabilmektedir (12).

b) BP tanısında ELİSA

Bir çok çalışma BP tanısında ELİSA'nın oldukça sensitif ve spesifik olduğunu desteklemektedir. Özellikle rekombinant proteinlerin kullanıldığı ELİSA testleri BP tanısında bir dönüm noktasıdır. Piyasada bulunan EUROIMMUN (Lübek, Almanya) ve MBL (Nagoya, Japonya) ELİSA testleri ile sırasıyla %80-90 ve %60-70 oranında kanda dolaşan BP180 NC16A ve BP230 C-terminal fragmandaki otoantijenlere karşı gelişen otoantikörler saptanabilmektedir. Bu iki test kombine kullanıldığında tanısal sensitivite %90-100 olarak bildirilmiştir (19,58,185). BP230 rekombinant proteinlerin kullanıldığı ELİSA, BP180'e göre daha az sensitif ve spesifiktir (210,211). BP180 NC16A domaini ve diğer BP180 epitoplarına karşı gelişen IgG otoantikörlerinin serumdaki konsantrasyonu ile hastalık aktivitesi ve şiddeti ilişkili bulunmuştur

(133,212,213,214,215). BP230 antijenine karşı gelişen otoantikörler ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişki ise çelişkilidir (58,133,216).

Polimorfik kaşıntılı deri hastalığı olan yaşlı bireylerde de BP180 ve BP230 antijenlerine karşı IgG otoantikörlerinin önemli ölçüde yüksek oranlarda saptandığı akılda tutulmalıdır (217). Bu nedenle DİF ile dokudaki otoantikörler gösterilmeden sadece ELİSA ile BP tanısı konulmamalıdır (107).

2.5.6. İmmüno blotting ve immüno presipitasyon

Her iki yöntem de hedef antijeni elektroforez ile ayrıştırılmış belirli moleküler ağırlıktaki protein bantları olarak saptar.

Pemfigus tanısında immüno blotting yöntem ile Dsg3'e karşılık gelen 130-kDa bandı hedef alan hastanın serumundaki IgG tipi otoantikörler gösterilmektedir. Deri tutulumu olan hastaların serumunda Dsg1'e karşılık gelen 160-kDa bandı hedef alan otoantikörler da bulunmaktadır (31). PNP tanısında en sensitif yöntem olduğu yönünde yayınlar mevcuttur (218), karakteristik olarak çift bant 210-kD ve 190-kD proteinler gözlenir (219).

BP tanısında immüno blottingin sensitivitesi değişkendir. Hastaların %75'inde BP230 antijeni ile reaksiyon oluşurken %50'sinde BP180 antijeni ile reaksiyon gözlenir. Hem IgG hem de IgA tipi otoantikörler saptanabilir (220).

İmmüno presipitasyon'da da BP230 ve BP180 antijenlerine karşı reaksiyon gözlenir (60).

2.5.7. Elektron mikroskopisi

OBH'da elektron mikroskopisi (EM) için biyopsi perilezyonel alandan veya taze bir bölge alınmalıdır.

PV'de EM'de akantoliz keratinositler arası bağın kaybı olarak gözlenir, iki desmozom plağı ayrılır ve tenofilamentlerin oluşturduğu tek bağlantı plağı görülebilir (221).

BP'de bül oluşumu çapalayan fibriller ve hemidesmozomların kaybı ile bazal membranda lamina lusida seviyesinde gözlenmektedir (60).

2.5.8. İmmünelektron mikroskopisi

Altınla işaretleme yapılan bu yöntemin çözünürlüğü EM'ye göre daha yüksektir ve kantitatif analizler uygulanabilmektedir.

İmmün-EM ile PV ve PF'de otoantikorların epidermisteki desmozomlara, özellikle ekstraselüler kısmına bağlandığı gösterilmiştir. PV'de her bir desmozoma bağlanan altın partikülü sayısı epidermin alt tabakalarında daha fazla iken PF'de epidermin üst tabakalarında daha fazla bulunmuştur (221).

BP'de ise bu yöntem ile BP230 ve BP180'e karşı oluşan dolaşımdaki otoantikorların sırasıyla, hemidesmozomal plağa ve lamina lusida düzeyinde hemidesmozomların altına bağlandığı gözlenmiştir (2).

2.5.9. İİF mozaik tabanlı BİYOÇİP

Son dönemlerde tanıda DİF ve ELİSA'dan daha ucuz, pratik ve hızlı yapılabilir bir test elde etmek amacıyla İİF mozaik tabanlı BİYOÇİP yöntemi geliştirilmiştir. OBH'nın tanısında tarama testi olarak kullanılabilecek bir yöntem olarak gelecek vaat etmektedir. Bir BİYOÇİP üzerinde birden fazla antijenik yapının bulunması tek bir serum örneği ile OBH arasında ayırıcı tanı yapma olanağı sunmaktadır (3,4,5,6,7).

2.5.10. Diğer laboratuvar bulgular

PE olgularında değişen oranlarda (%30-80) antinükleer antikor (ANA) pozitifliği bildirilmiştir (177). ANA pozitifliği nadiren Kolombiya tipi endemik pemfigus hastalarında da saptanmaktadır (31). Bunun dışında eozinofilik spongiyoz olan hastaların tam kan sayımında da sıklıkla eozinofili gözlenmektedir. BP hastalarının yaklaşık %50'sinde periferik kanda eozinofili ve yüksek IgE düzeyleri saptanmıştır (2,163).

2.6. Ayırıcı Tanı

2.6.1. Pemfigusta ayırıcı tanı

PV'nin mukozal lezyonlarının ayırıcı tanısına akut herpetik stomatit, aftöz stomatit, büllöz ilaç reaksiyonları, eritema multiforme, Stevens-Johnson sendromu, liken planus, sistemik lupus eritematozus ve müköz membran pemfigoidi girer. Kutanoz lezyonları için ayırıcı tanıyı ise; pemfigusun diğer formları, BP, lineer IgA dermatozu, eritema multiforme, Hailey-Hailey hastalığı ve transiyen akantolitik dermatoz (Grover

hastalığı) oluşturur. PVE’de ise kondiloma aküminata, kondiloma lata, piyodermatitis-piyostomatitis vejetans ve Hailey-Hailey hastalığı ayırıcı tanıda düşünülmelidir.

PF’nin ayırıcı tanısında diğer pemfigus formları, büllöz impetigo, SPD, lineer IgA dermatozu düşünülmelidir. Özellikle PE alt tipinde seboreik dermatit ve subakut kutanöz lupus eritematozus ekarte edilmelidir.

IgA pemfigusunun ayırıcı tanısında SPD, PF, büllöz impetigo, dermatitis herpetiformis ve püstüler psöriazis düşünülmelidir. SPD tipi IgA pemfigusu ile SPD klinik ve histopatolojik olarak birbirinden ayırt edilemez, IgA pemfigusunu diğer hastalıklardan ayırmak için IgA otoantikörlerinin gösterilmesi gereklidir.

PH’nin klinik görünümü tipik değildir, başlangıç lezyonları sıklıkla dermatitis herpetiformis, BP, lineer IgA dermatozu veya PF gibi çeşitli büllöz hastalıkları taklit edebilir.

PNP ayırıcı tanısını PV, skatrisyel pemfigoid, eritema multiforme, Stevens-Johnson sendromu, liken planus, GVHD, inatçı HSV ve diğer viral enfeksiyonlar oluşturur. Kemoterapiye bağlı stomatit de ayırıcı tanıda düşünülmelidir (1,79,153).

2.6.2. BP’de ayırıcı tanı

BP’nin bülsüz fazında klinik bulgular nonspesifik olup, ilaç reaksiyonları, kontakt dermatit, prurigo simpleks, prurigo nodularis, ürtikeryal dermatit, alerjik ürtikeryel reaksiyonlar, vaskülit, arthropod ve uyuz dahil birçok dermatoza benzerlik gösterebilir. Klinik olarak bül varlığında ise büllöz arthropod ısırıkları, edinsel epidermolizis bülloza, lineer IgA dermatozu, pemfigus, alerjik kontakt dermatit, Stevens-Johnson sendromu, büllöz ilaç reaksiyonları, pomfoliks, psödoporfirya veya porfiria kutanea tarda ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Özellikle çocuklarda büllöz impetigo, kalıtsal epidermolizis bülloza ve büllöz mastositoz da ayırıcı tanıda yer alır (2,153,163).

2.7. Tedavi

OBH'da tedaviye başlamadan önce tanı histopatolojik ve immunfloresan veya ELİSA ile otoantikörler gösterilerek doğrulanmalıdır. Hastalar hastalıkları hakkında bilgilendirilmelidir. Yeni tanı pemfigus hastalarında ilk basamak, tetikleyici faktör olarak ilaç kullanımının sorgulanmasıdır (Bkz. Çizelge 2.3).

2.7.1. Pemfigus tedavisi

Pemfigus hastalığı için sistemik kortikosteroidler hayat kurtarıcıdır ve tedavide kullanımı açısından mutlak bir kontraendikasyon yoktur (72). Pemfigusta birçok tedavi yöntemi bulunmakla birlikte çok azıyla randomize çalışmalar mevcuttur (20,21). Önerilen tedaviler sınırlı sayıdaki yayın ve uzman görüşlerine dayanmaktadır, standart veya ideal tedavi protokolü henüz oluşturulamamıştır (72,22).

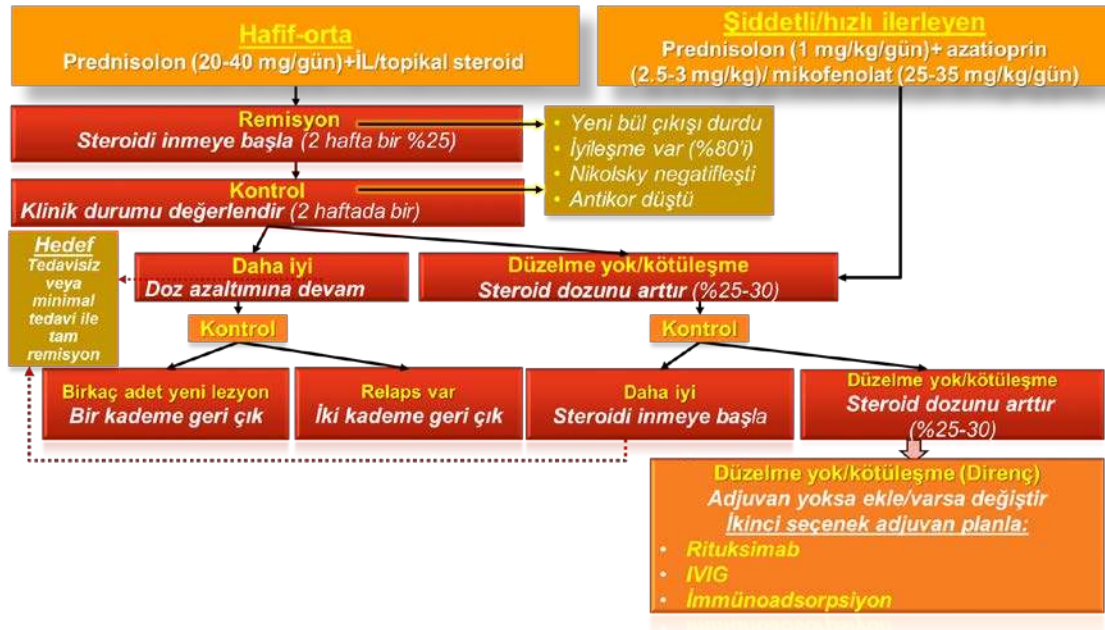
Tedavide kullanılan ajanlar hızlı etkili ve geç etkili olarak ikiye ayrılabilirler (Çizelge 2.4). Hızlı etkili ajanlar hastalık aktivitesini kontrol altına almak için kullanılırken geç etkili ajanlar sistemik kortikosteroid ihtiyacını en aza indirmek için kullanılmaktadır. Sistemik kortikosteroidler hala tedavinin temelini oluşturmaktadır. Ancak standart olarak kullanılabilecek bir doz şeması bulunmamaktadır (223). Kortikosteroidlerin keşfinden önce pemfigus vulgaris hastalarının %75-80'inin bir yıl içinde kaybedildiği bildirilmiştir (12,224). Günümüzde ise mevcut tedavi olanakları ile bu oranın %5-10 arasında olduğu tahmin edilmektedir (31,45,225). Sistemik kortikosteroidler hayat kurtarıcı olmakla birlikte, ciddi morbidite nedeni olabilecek yan etkilere sahiptir. Geçmişte hastalığın etkileri nedeni ile kaybedilen hastalar günümüzde başta kortikosteroidler olmak üzere tedavide kullanılan immünsüpresif ajanların yan etkileri sonucu kaybedilmektedir. En önemli ölüm nedeni enfeksiyondur (226).

Çizelge 2.4. Pemfigus tedavisi (12).

Hızlı etkililer (Hastalık aktivitesini kontrol altına alan ajanlar)	Yavaş etkililer (Sistemik kortikosteroid ihtiyacını azaltan ajanlar)
Sistemik steroidler İViG Plazmaferez Pulse steroid (yüksek doz)	İmmünosüpresif ilaçlar; azatiyopürin, metotreksat, siklofosamid, siklosporin, mikofenolat mofetil Antibiyotikler Dapson Altın

Tedavide temel amaç en düşük ilaç dozu ve en az yan etki ile remisyonu sağlamak, sürdürmek ve kür elde etmektir. Hastalığın şiddeti, seyri ve tedaviye yanıtı hastadan hastaya farklılıklar göstermektedir. Tüm hastalara uygulanabilecek ideal bir tedavi şeması bulunmamaktadır, tedavi bireyselleştirilmelidir. Kortikosteroidler pemfigus tedavisinde ilk basamak ve temel ilaçlardır. Özellikle progresif görüntü çizen hastalarda birlikte immünosupresif başlamak uygun görülmektedir. İmmünsüpresif tedavi alan doğurganlık çağındaki kadınlarda uygun yöntemlerle kontrasepsiyon sağlanmalıdır. Dünyada en sık adjuvan tedavi olarak azatiyoprin kullanılmaktadır. Maliyetin yüksek olması nedeni ile mikofenolat mofetil sık kullanılamamaktadır. Metotreksat, dapson, siklofosfamid, İVİG ve immünoabsorpsiyon diğer adjuvan tedavi seçenekleridir. Plazmaferez, siklosporin, takrolimus, tetrasiklin, niasinamid ve altın tedavilerinin de pemfigus tedavisinde yeri vardır (12). Son yıllarda tedavide öne çıkan ve gelecek vadeden bir diğer tedavi ajanı ise rituksimabdır (227). IgA pemfigusunda ise öne çıkan tedavi seçeneği dapsondur (1). Kliniğimizde uygulanan pemfigus tedavi algoritması Şekil 2.7’de gösterilmiştir.

İnatçı lezyonlar klobetazol propiyonat gibi süperpotent topikal steroidler veya intralezyonel kortikosteroid enjeksiyonları ile tedavi edilebilir (72). Topikal takrolimus kullanımının da yararlı olabileceği yönünde yayınlar mevcuttur (12). Tedaviye daha yavaş yanıt veren oral lezyonlarda en etkili tedavi seçeneği 20 mg/ml dozunda triamisinolon asetonid enjeksiyonlarıdır (230).



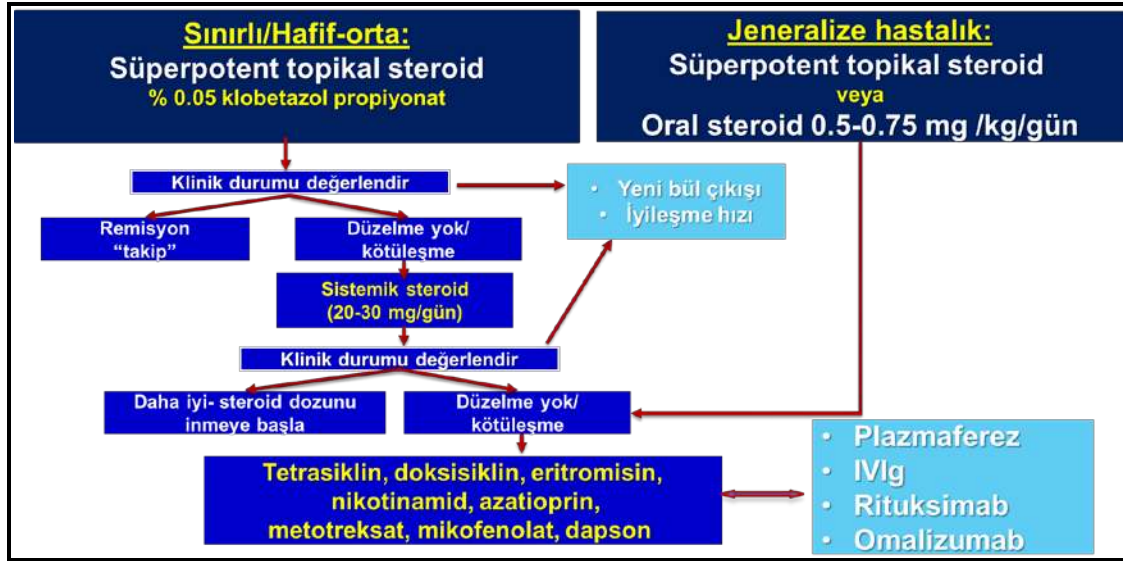
Şekil 2.7. Kliniğimizde uygulanan pemfigus tedavi algoritması.

Hastalığın kontrol altına alındığının klinik işaretleri; yeni lezyon çıkışının durması, var olan erozyon ve ülserlerin epitelize olması ve başlangıçta pozitif ise Nikolsky belirtisinin negatifleşmesidir (72). Tedavi ile lezyonlar kurulanır ve bunu reepitelizasyon izler, lezyon alanında hiperpigmentasyon kalabilir ancak skar oluşumu gözlenmez. PVE’de ise gevşek bül ve püstüller vejetatif plaklara dönüşerek iyileşirler.

Tedavinin ne zaman kesilmesi gerektiği konusunda da farklı görüşler bulunmaktadır. Birçok otör klinik remisyona dayanarak tedaviyi keserken, diğerleri immünolojik remisyonu temel almaktadırlar. Klinik remisyonda olan, ancak DİF pozitif hastalarda relaps oranı, DİF negatif hastalara göre yüksek bulunmuştur. Çekilen anajen kılın dış kök kılıfı DİF sonucu negatif saptandığında deri biyopsisi ile DİF tetkikinin uygulanmasını ve her iki tetkik de negatif saptandığında tedavinin kesilmesini öneren görüşlerde mevcuttur (231). Adjuvan immunosüpresif tedavi alan hastalarda kortikosteroid tedavisinin sonlandırılmasından sonraki 3-6 ay içerisinde adjuvan tedavinin kesilmesi önerilen bir yaklaşımdır (72).

2.7.2. BP tedavisi

BP’de temel tedavi seçeneği kortikosteroidlerdir. Son dönemlerde hafif BP olgularının tedavisinde topikal kortikosteroidlerin etkili ve güvenli olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır. Özellikle sınırlı formun tedavisinde ilk basamak olarak, yaşlı ve genel durumu bozuk olan hastalarda etkinliğinin yanı sıra güvenilirliği nedeni ile de tercih edilebilmektedir (232,233). Sistemik kortikosteroidlerin ise şiddetli olgularda en etkili seçenek oldukları kabul edilmektedir, prednizon 0,5-0,75 mg/kg dozda 3 hafta içerisinde hastalık kontrolü sağlanmaktadır (2,19,234). Adjuvan veya alternatif olarak kullanılan minosiklin, tetrasiklin, nikotinamid, azatiyopirin, dapson ve sulfonamidler, siklofosfamid, metotreksat, siklosporin, mikofenolat mofetil, İVİG, klorambusil, plazmaferes ve rituksimab ile ilgili geniş serili kontrollü çalışmalar bulunmamaktadır. Kliniğimizde uygulanan BP tedavi algoritması Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Kliniğimizde uygulanan BP tedavi algoritması.

Lezyonlar iyileşirken yerlerinde postinflamatuvar hiperpigmentasyon veya hipopigmentasyon bırakabilirler, daha nadir olarak milia görülebilir.

2.8. Skorlama Sistemleri

Pemfigus ve BP’de hastalığın yaygınlığı ve tutulum şiddeti tedavi öncesi belirlenmelidir. Son yıllarda pemfigusun aktivite ve şiddetini belirlemeye yönelik iki klinik skorlama sistemi geliştirilmiştir. Bunlar; ABSİS “Autoimmune bullous skin disorder intensity score” ve pemfigus hastalığı alan indeksidir (PDAI) (235). BP’de ise hastalığın takibinde kullanılmak üzere ABSİS ve 2011 yılında BP hastalığı alan indeksi (BPDAI) skorlaması geliştirilmiştir (165,235).

2.9. Prognoz ve Diğer Hastalıklar ile İlişki

2.9.1. Pemfigusta prognoz ve diğer hastalıklar ile ilişki

Pemfigus sıklıkla kronik seyirli ve relapslarla karakterize bir hastalıktır. İyi prognostik faktörler arasında erken tanı, hastalığın başlangıcından itibaren orta-hafif şiddette olması, tedaviye hızlı yanıt alınması, eşlik eden özellikle hipertansiyon, diyabetes mellitus gibi hastalıkların bulunmaması ve hastanın genç yaşta olması yer alır (72). PV’de deri ve mukoza tutulumu birlikteliği tek başına deri ve tek başına mukoza tutulumundan daha sık olup prognozu daha kötü olarak bildirilmiştir (45). Tedavi

edilmeyen PF'nin prognozu PV'ye göre daha iyidir. Ancak PF'nin tedavisi PV'den daha kolay değildir, hastalığı kontrol altına alabilmek için benzer dozlarda ilaç kullanılır ve relaps oranları benzerdir (236). Hatta Tunus tipi endemik pemfigus hastalarında genç yaşa rağmen yüksek (%14) mortalite oranları bildirilmiştir (237). PV'nin klinik seyrinde PF'ye dönüşebileceğini (144), benzer şekilde PF'nin de klinik seyrinde PV'ye dönüşebileceğini bildiren yayınlar mevcuttur (238). Pemfigus hastalığında en önemli ölüm nedeni enfeksiyondur (226). En kötü prognoz ise tedaviye rağmen mortalitenin %90 olduğu PNP'dedir (239), ölüm nedeni sıklıkla solunum yetmezliğidir (102).

PV ve PF'nin, Myastenia Gravis, timoma ve otoimmün troid hastalıkları ile birliktelikleri bildirilmektedir (79,240).

2.9.2. BP'de prognoz ve diğer hastalıklar ile ilişki

Hastalık kronik seyrlidir ve ataklarla seyreder. Yapılan prospektif bir çalışmada tedavinin kesilmesinden sonra 6 ay içerisinde %45 oranında relaps bildirilmiştir. Tedavi kesiminde ELİSA anti-BP180 (NC16A) otoantikorlarının, “cut-off” değerinin 3 katı olması relaps riskinin yüksek olduğunu gösteren iyi bir belirteç olarak bulunmuştur (241). BP'de kötü prognostik faktörler olan ileri yaş, yaygın hastalık, düşük Karnofsky skoru ve yüksek doz oral kortikosteroid ise ölüm için önemli risk faktörleridir (242). 1 yıllık mortalite %20-40 arasında, kontrol grubundan 2-3 kat yüksek olarak bildirilmiştir.

Son yıllarda BP hastalarının üçte biri ila yarısında nörolojik hastalıklar saptandığı dikkati çekmiştir. Özellikle majör kognitif bozukluk, Parkinson hastalığı, inme, epilepsi, multiple skleroz kontrollü çalışmalarda BP ile ilişkili bulunmuştur (19,58). Ayrıca BP180 ekspresyonu sıçanlarda serebellumda ve otopsilerde insan beyninin farklı nöroanatomik lokalizasyonlarında, özellikle yaşlı postmitotik nöronların lipofuksin granüllerinde saptanmıştır (243,244). BP'nin otoimmün hastalıklar ve inflamatuvar dermatozlar ile ilişkisi araştırılmış anlamlı bir bulgu saptanamamıştır. BP ile kanserler arasındaki ilişkiye bakıldığında ise özellikle gastrik kanser olmak üzere BP ile kanser arasında düşük ilişki saptanmıştır (19).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Tanımlanması

Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları polikliniğine yeni başvuran veya takipli; klinik, histopatolojik ve immünfloresan ve/veya ELİSA yöntemleriyle pemfigus veya BP tanısı konan sistemik tedavi kullanmamış veya tedavi alırken relaps gelişen 63 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise bilinen otoimmün bir hastalığı olmayan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları polikliniğine başvuran ve mevcut hastalığı nedeni ile kan tetkiki istenilen 35 kişi dahil edilmiştir. Kontrol grubu hem pemfigus hem de BP grubunda ortak kullanılmıştır. Çalışmaya katılan gönüllü hasta ve kontrol grubundan aydınlatılmış onam alınmıştır.

Hastaların demografik verileri, klinik özellikleri, pemfigus veya BP tanısını destekleyen histopatoloji, DİF ve İİF bulguları hasta formlarına kaydedilmiştir. Hastaların çalışmaya dahil edildiği dönemdeki ABSİS ve/veya PDAI değerleri hesaplanmış, kutanöz ve mukozal tutulumları değerlendirilmiştir. Yine bu dönemde alınan periferik venöz kan örneklerinde ELİSA (EUROIMMUN) testi ile saptanan anti-Dsg1, anti-Dsg3, anti-BP180 ve envoplakin antikor düzeyleri formlara kaydedilmiştir. Hastalardan, hastalığın tanısını koymak veya takip amacıyla ELİSA testi için alınan periferik venöz kan örnekleri santrifüj edilerek serumun bir kısmı -20°C’de muhafaza edilmiş ve yeterli hasta sayısına ulaşıldığında serumdaki otoantikorları saptamak amacıyla EUROIMMUN (Mozaik 7) mozaik tabanlı İİFBİYOÇİP’leri ile çalışılmıştır. Kontrol grubu olarak çalışmaya katılan gönüllülerden hastaneye başvurma nedenleri olan mevcut hastalıkları için alınan periferik venöz kan örnekleri santrifüj edilerek serumun bir kısmı -20°C’de muhafaza edilmiş yeterli gönüllü sayısına ulaşıldığında EUROIMMUN mozaik tabanlı İİFBİYOÇİP’leri ve ELİSA (EUROIMMUN) ile çalışılmıştır. Test sonuçları hasta takip formlarına kaydedilmiştir.

3.2. EUROIMMUN Mozaik Tabanlı İİF BİYOÇİP Yöntemi

BİYOÇİP yöntemiyle birden fazla antikor spesifik antijenik substrat kullanılarak OBH’da tanıya ulaşmak amaçlanmaktadır. Standart boyuttaki slaytta on inkübasyon alanı (her bir inkübasyon alanı 1 hastaya ait), her inkübasyon alanında substrat olarak altı farklı antijenik yapı bulunmaktadır (Şekil 3.1). Bunlar maymun özefagusu kesiti, 1mol/L NaCl’de ayrıştırılmış insan derisi kesiti, Dsg1, Dsg3 ve BP230 globüler C-terminal domaini aktarılmış HEK293 hücreleri ve rekombinant tetramerik BP180NC16A antijen spotlarıdır. Alınan hasta serumları 1/10 dilüe edilerek 30 dakika oda sıcaklığında substratlarla inkübe edilmiş (Şekil 3.2) ve hasta serumundaki antikorların BİYOÇİP’te bulunan antijenlere bağlanmasını sağlayan bu ilk inkübasyon sonrası PBS-Tween ile 5 dakikalık yıkama işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.3). Floresan işaretli anti-human antikorlarla yapılan 30 dakikalık ikinci inkübasyon oda sıcaklığında karanlık ortamda yapılmıştır (Şekil 3.4). Sonrasında 5 dakika yıkama uygulanan slaytlar immunfloresan mikroskopunda değerlendirilmiştir (Şekil 3.5). Değerlendiren araştırmacı hastaların tanısı hakkında, değerlendirilen BİYOÇİP’in hasta serumuyla mı yoksa kontrol grubu serumuyla mı inkübe edildiği konusunda bilgilendirilmemiş (tek kör), hasta ve sağlıklı gönüllü katılımcı serumları pozitif kontrollerle karşılaştırılarak aynı slayt üzerinde değerlendirilmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8). BİYOÇİP tetkikinde pemfigus ve BP için pozitif kontrol birer kez çalışılmış, testin standarda uygun çalıştığı saptanmıştır.



Şekil 3.1. Mozaik tabanlı İİF BİYOÇİP slaytı (EUROIMMUN-Mozaik 7).



Şekil 3.2. Hasta serumlarının dilüsyonu (a) ve substratlarla inkübasyonu (b).



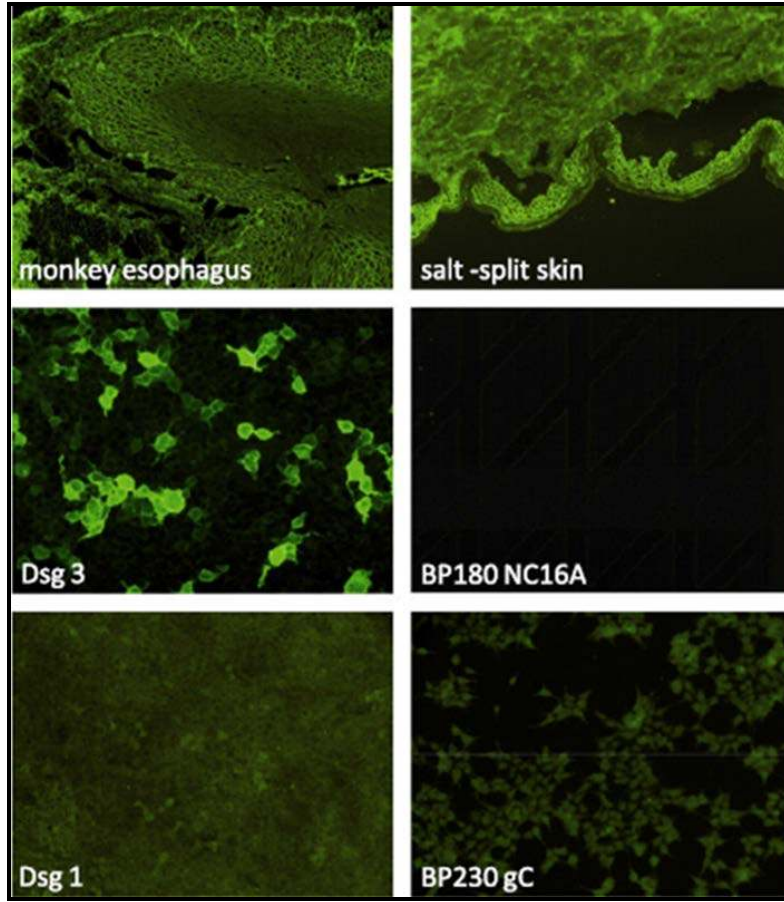
Şekil 3.3. İlk inkübasyon sonrası PBS-Tween ile yıkama işlemi.



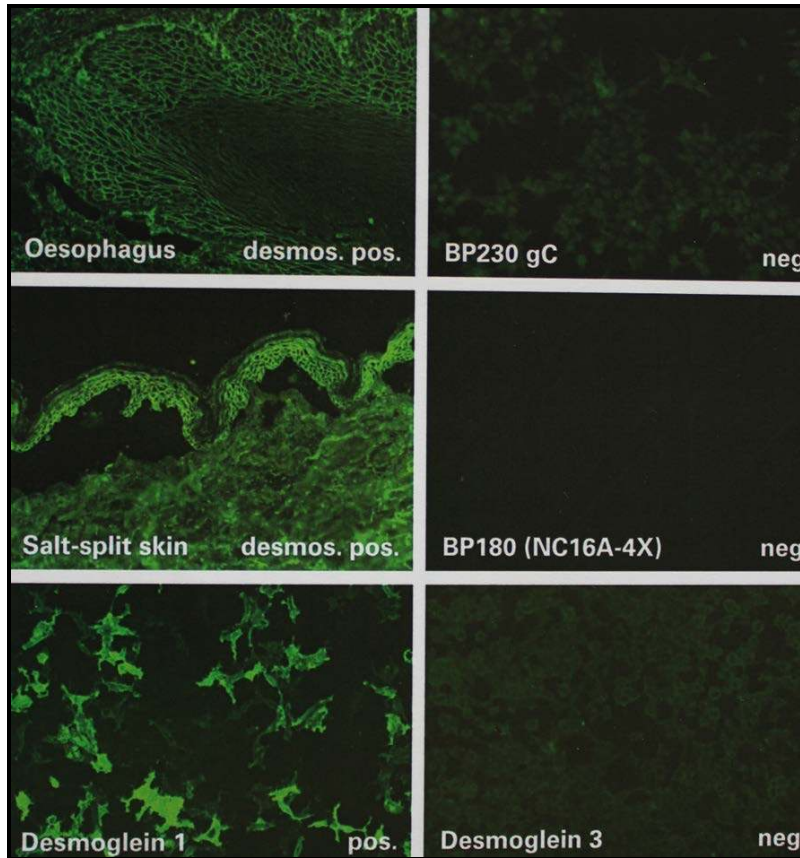
Şekil 3.4. Floresan işaretli anti-human antikorlarla yapılan ikinci inkübasyon.



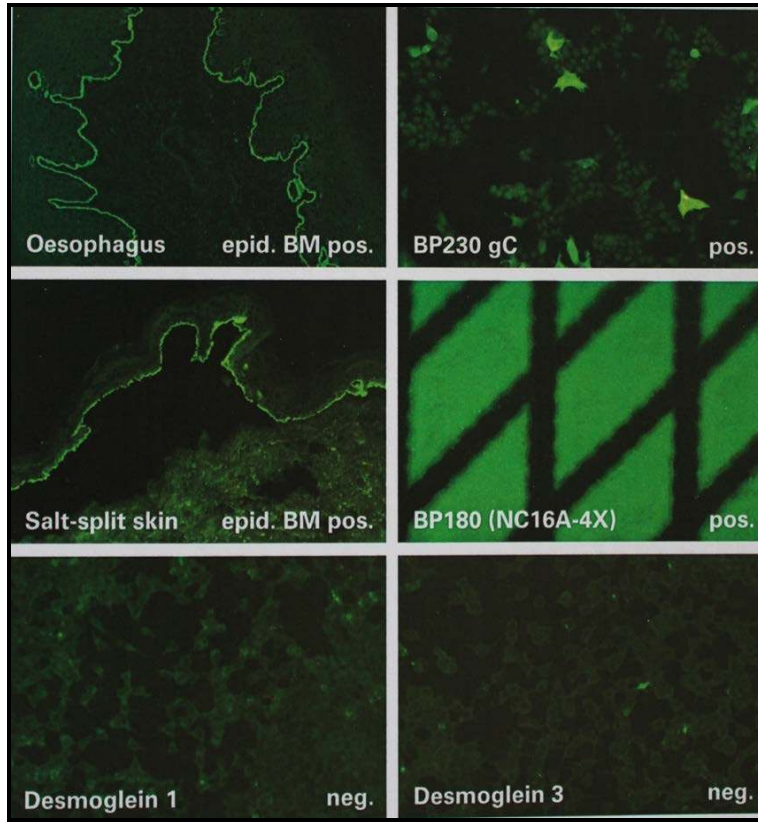
Şekil 3.5. İşlem sonrası BİYOÇİP slaytının immunfloresan mikroskopunda incelenmesi.



Şekil 3.6. PV tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta İSA ve anti-Dsg3 pozitifliği).



Şekil 3.7. PF tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta İSA ve anti-Dsg1 pozitifliği).



Şekil 3.8. BP tanısı koyduran BİYOÇİP pozitifliği (özefagusta BMZ boyunca lineer ve TAİD’de epidermal depolanma, anti-BP180 ve anti-BP230 pozitifliği).

3.3. ELİSA Testi

Hasta ve kontrol grubunun serum örnekleri yeterli örnek sayısına ulaşıldığında çözdürüldü ve üretici firmanın (EUROIMMUN, Lübek, Almanya) önerileri doğrultusunda Mikrokuyu ELİSA yöntemi ile çalışıldı. Anti-Dsg1, anti-Dsg3 ve anti-BP180 testleri için sırasıyla memeli hücresinde eksprese olan rekombinan ekstrasellüler Dsg1 proteini (5 alt domainden oluşan domainin tamamı) ile, memeli hücresinde eksprese olan rekombinan ekstrasellüler Dsg3 proteini (5 alt domainden oluşan domainin tamamı) ve Escherichia coli’de eksprese olan NC16A domaininin (BP180) immünojenik tetrameri ile kaplı ELİSA pleytleri kullanıldı. Her bir test için 2, 20 ve 200 RU/mL konsantrasyonunda analit içeren üç farklı kalibratör ve pozitif – negatif kontrol kullanıldı. Hasta ve kontrol grubu örneklerinin tamamı, çalışma öncesinde, kit içerisinde sunulan dilüsyon tamponu ile 1/101 oranında sulandırıldı. Prosedür sonunda absorbands değerleri, 620 nm dalga boyu referans olarak kullanılarak 450 nm dalga boyunda elde edildi. Hasta ve kontrol grubu örneklerindeki analit konsantrasyonları, kalibratörlerce oluşturulan eğri kullanılarak, RU/mL cinsinden hesaplandı. 20 RU/mL altındaki

konsantrasyonlar negatif olarak kabul edildi. 20 ile 200 RU/mL arasındaki konsantrasyonlar kantite edilirken, 200 RU/mL üzerindeki değerler kantite edilemedi.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Versiyon 22.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. BİYOÇİP yönteminin tanı değeri altın standart kabul edilen immunfloresan ve/veya ELİSA testi sonuçları ile karşılaştırılmış geçerlilik için sensitivite ve spesifisite değerleri hesaplanmıştır. Sensitivite; referans teste göre pozitif olguların BİYOÇİP yöntemi ile belirlenen test sonucunda pozitif bulunma yüzdesi ve spesifisite; referans teste göre negatif olguların BİYOÇİP yöntemi ile belirlenen test sonucunda da negatif olarak bulunma yüzdesi olarak tanımlanmıştır. İki tanı yönteminin birbiri ile tutarlılığı (consistency, agreement) ölçülürken kappa değeri hesaplanmıştır. Tutarlılık; her iki tanı yönteminin de pozitif veya her iki tanı yönteminin de negatif kararı vermiş olduğu olgu sayısının toplam olgu sayısına bölünmesi ile elde edilmiştir. Kappa; gözlenen tutarlılıktan şansa bağlı tutarlılığın arındırılması ile elde edilmiştir. Aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Kappa} = (\text{Gözlenen Tutarlılık} - \text{Şansa bağlı Tutarlılık}) / (1 - \text{Şansa bağlı Tutarlılık})$$

Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Sapma şeklinde ifade edilmiştir. Bütün analizlerde $p < 0,05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. ELİSA ile elde edilen otoantikör titrelerinin ortalamaları karşılaştırılırken gruptaki varyanslar yüksek olduğundan t-testinin non parametrik karşılığı olan Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Pemfigus Grubu Verileri

Çalışmaya 29 yeni tanı, 16 relaps olmak üzere toplam 45 pemfigus hastası ve 35 diğer deri hastalıklarına sahip kontrol grubu hastası dahil edildi. Pemfigus hastalarının 25'i kadın, 20'si erkekti ve yaş aralığı 25-75, yaş ortalaması $51,22 \pm 12,76$ olarak saptandı. Kontrol grubunun ise 17'si kadın, 18'i erkekti ve yaş aralığı 21-73, yaş ortalaması $42,42 \pm 16,02$ olarak saptandı. Çalışmaya dahil edilen yeni tanı pemfigus hastalarının ortalama hastalık süresi 10 ay olarak hesaplandı, relaps hastalarında ise hastalık süresi 3 yıl 11 ay idi. Pemfigus hastalarından; 3'ü PF, 1'i PH, 1'i IgA pemfigus, 1'i PVE ve geriye kalan 39 hasta PV hastası idi. Hastalığın başlangıç yaşı $46,35 \pm 12,21$, hastaların ortalama PDAI değeri $25,76 \pm 22,32$ ve ABSİS değeri $29,09 \pm 23,04$ olarak hesaplandı. Hastaların %53,3'ünde çalışmaya dahil edildiğinde 10 ve üzerinde bül ve/veya erozyon mevcuttu. Hastaların %66,7'sinde belirgin mukozal tutulum gözlemlendi. Mukozal tutulum en sık oral mukozada %80 oranında gözlemlendi. Bunu sırasıyla; 6 hastada nazal, 5 hastada genital, 3 hastada konjunktival ve 2 hastada anal tutulum izledi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Pemfigus ve kontrol grubu hastalarının demografik ve klinik verileri.

Özellik	Pemfigus	Kontrol grubu
Cinsiyet Kadın Erkek	25 20	17 18
Yaş ortalaması	$51,22 \pm 12,76$	$42,42 \pm 16,02$
Klinik Yeni tanı Relaps	29 16	-
Hastalık süresi ortalaması Yeni tanı Relaps	10 ay 3 yıl 11 ay	-
PDAI ortalaması	$25,76 \pm 22,32$	-
ABSİS ortalaması	$29,09 \pm 23,04$	-
Bül ve/veya erozyon sayısı 0-2 adet 3-5 adet 6-10 adet 10 adet üzeri	9 5 7 24	-
Mukozal tutulum (n) Oral Nazal Konjunktival Genital Anal	36 6 3 5 2	-

Bu çalışmaya dahil edilen klinik, histopatolojik ve immünfloresan ve/veya ELİSA yöntemleriyle pemfigus tanısı konan 45 hastanın 41'ine BİYOÇİP yöntemi ile de pemfigus tanısı konuldu. Kontrol grubundaki 35 hastanın ise bir tanesine BİYOÇİP yöntemi ile pemfigus tanısı konuldu (yalancı pozitiflik %2,9). EUROIMMUN mozaik tabanlı İİFBİYOÇİP yönteminin sensitivitesi %91,1, spesifisitesi %97,1 olarak saptandı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Pemfigus tanısında BİYOÇİP yönteminin değeri.

BİYOÇİP testine göre pemfigus*	Referans yöntemlere göre pemfigus**				Toplam	
	Pozitif	%	Negatif	%	n	%
Pozitif	41	91,1	1	2,9	42	52,5
Negatif	4	8,9	34	97,1	38	47,5
Toplam	45	100,0	35	100,0	80	100,0

* Bioçip yöntemi ile özefagus kesitinde İSA'da immünreaktan birikimi ve/veya anti-Dsg1 ve/veya anti-Dsg3 otoantikörlerin saptanması olarak tanımlanmıştır.

**DİF'de İSA'da immünreaktan birikimi ve/veya ELİSA testinde anti-Dsg1 ve/veya Dsg3 otoantikörlerinin saptanması olarak tanımlanmıştır.

Sensitivite = 0,911; Spesifisite = 0,971

Pemfigus tanısında altın standart testlerden olan DİF, 45 hastanın 37 sine uygulandı ve hastaların 19 (%51,4) tanesinde İSA pozitifliği saptandı. Dış merkezde alınan biyopsi sonucu pemfigus ile uyumlu gelip kliniğimize yönlendirilen hastalardan DİF için tekrar biyopsi yapılmayıp ELİSA ile tanı doğrulandığından pemfigus hastalarının 18'inin DİF tetkiki yapılmadı. BİYOÇİP yöntemindeki maymun özefagusu kesitinde İSA pozitifliği ise 45 hastanın 31'inde (%68,9) saptandı (Şekil 4.1). DİF ve BİYOÇİP testi arasında tutarlılık gözlenmedi (Çizelge 4.3). Çalışmamızda BİYOÇİP yöntemi ile özefagus kesitinde İSA pozitifliğinin spesifisitesi ise %100 bulundu (Grafik 4.1).

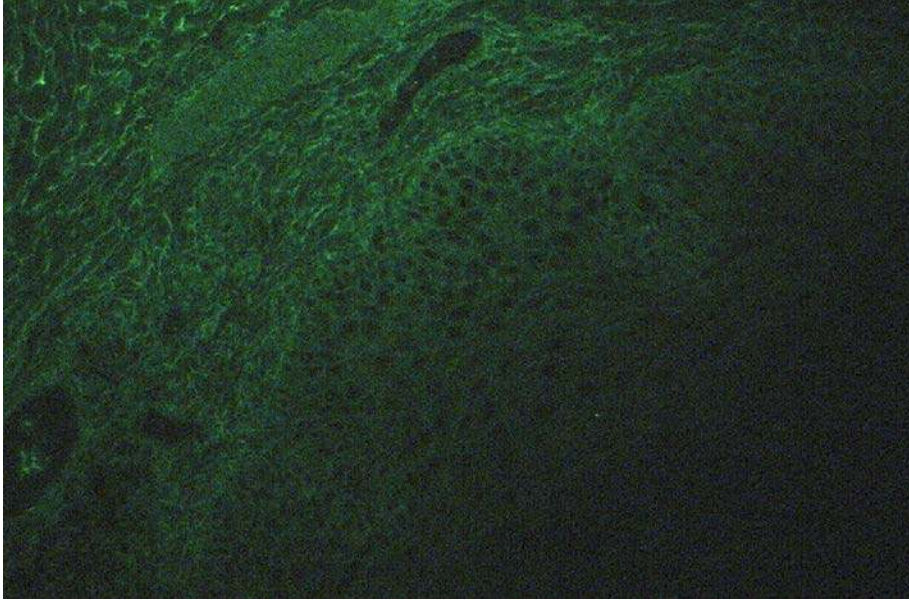
Çizelge 4.3. Pemfigus hastalarında İSA pozitifliğini saptamada DİF ve BİYOÇİP yönteminin uyumu.

BİYOÇİP-İSA	DİF-İSA		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	13	11	24
Negatif	6	7	13
Toplam	19	18	37

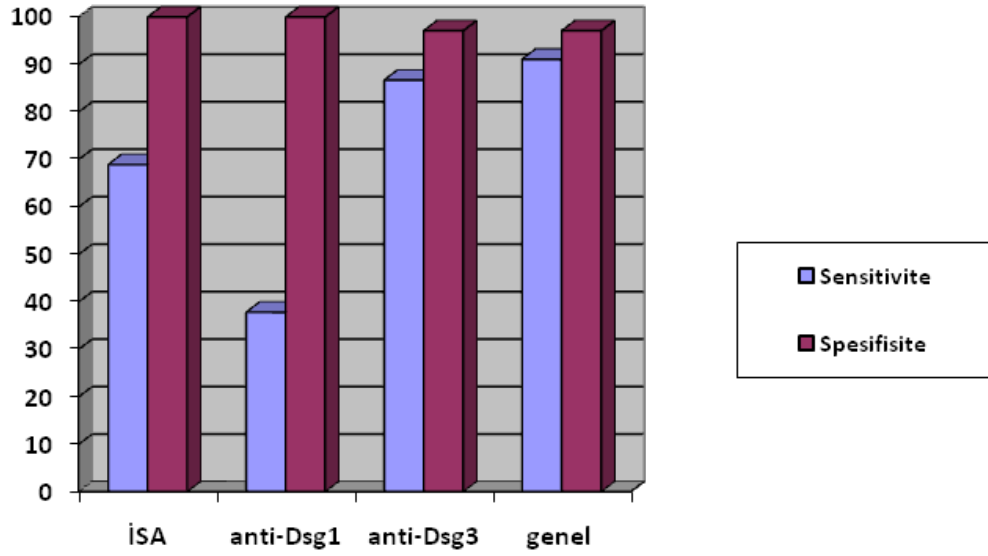
BİYOÇİP-İSA: BİYOÇİP yöntemi ile özefagus kesitinde İSA'da immünreaktan depolanması,

DİF-İSA: DİF tetkikinde İSA'da immünreaktan depolanması.

Tutarlılık = 0,5405; Kappa= 0,076; p = 0,642



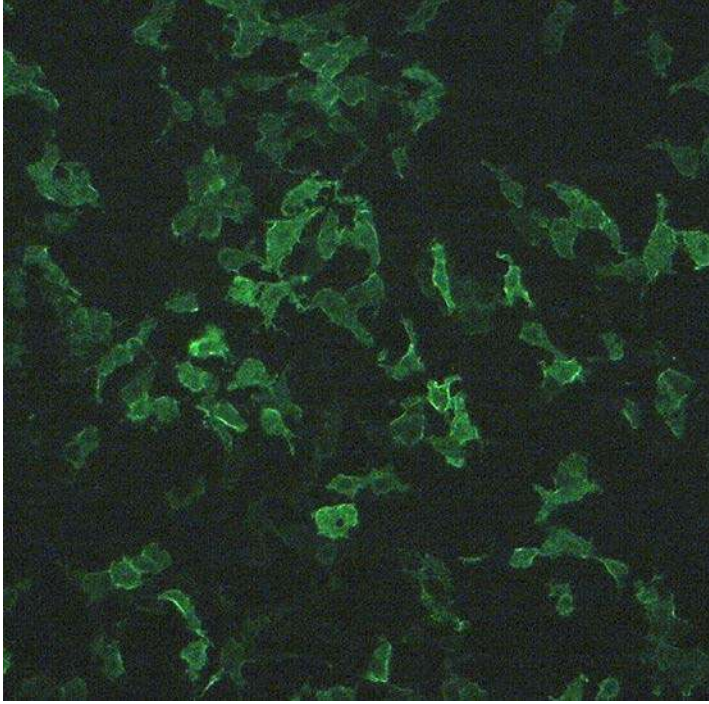
Şekil 4.1. İSA pozitifliği (*BİYOÇİP* maymun özefagusu, x600).



İSA; BİYOÇİP yönteminde özefagus kesitinde İSA pozitifliği, Anti-Dsg1; BİYOÇİP yönteminde anti-Dsg1 pozitifliği, Anti-Dsg3; BİYOÇİP yönteminde anti-Dsg3 pozitifliği, Genel; BİYOÇİP yönteminde özefagus kesitinde İSA ve/veya anti-Dsg1 ve/veya anti-Dsg3 pozitifliği.

Grafik 4.1. BİYOÇİP yönteminin İSA, anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 pozitifliği ile pemfigus tanısı koymadaki sensitivite ve spesifisitesi.

Pemfigus tanısında altın standart testlerden olan ELİSA testi ise hastaların (n:45) ve kontrol grubunun (n:35) tamamına uygulandı ve kontrol grubunun tamamında anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 otoantikorları negatif saptandı. Pemfigus hastalarının ise 25'inde anti-Dsg1, 39'unda anti-Dsg3 otoantikor pozitifliği saptandı. Pemfigus hastalarının ve kontrol grubunun tamamına uygulanan BİYOÇİP yönteminde pemfigus hastalarının 17'sinde anti-Dsg1, 39'unda anti-Dsg3 pozitifliği saptandı (Şekil 4.2). Pemfigus hastalarında bu yeni testin sensitivitesi ve spesifitesi anti-Dsg1 otoantikorlarını saptamada sırasıyla %37,8, %100 ve anti-Dsg3 otoantikorlarını saptamada sırasıyla %86,7, %97,1 olarak saptandı (Bkz. Grafik 4.1). Anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 otoantikorlarını saptamada, ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5).



Şekil 4.2. Anti-Dsg3 pozitifliği (BİYOÇİP_HEK290 hücreleri, x600).

Çizelge 4.4. Pemfigus ve kontrol grubunda anti-Dsg1 otoantikorlarını saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yönteminin uyumu.

ELİSA-anti-Dsg1*	BİYOÇİP-anti-Dsg1**		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	15	10	25
Negatif	2	53	55
Toplam	17	63	80

* ELİSA testi ile anti-Dsg1 otoantikorlarının tespiti.

** BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 otoantikorlarının tespiti.

Tutarlılık = 0,8500; Kappa = 0,538; $p < 0,01$

Çizelge 4.5. Pemfigus ve kontrol grubunda anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yönteminin uyumu.

ELİSA-anti-Dsg3*	BİYOÇİP-anti-Dsg3**		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	37	2	39
Negatif	3	38	41
Toplam	40	40	80

* ELİSA testi ile anti-Dsg3 otoantikörlerinin tespiti.

** BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 otoantikörlerinin tespiti.

Tutarlılık = 0,9375; Kappa = 0,659; $p < 0,01$

Çalışmamızda BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 pozitifliği saptanan 17 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg1 otoantikör titrelerinin ortalaması $132,12 \pm 72,79$ ve BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 pozitifliği saptanamayan 28 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg1 otoantikör titrelerinin ortalaması $38,29 \pm 67,06$ olarak hesaplandı. BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 pozitifliği saptanan hastaların otoantikör titreleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde anti-Dsg1 pozitifliği saptanamayanlara göre daha yüksek bulundu ($p < 0,001$). Benzer ilişkiye anti-Dsg3 otoantikörlerinde bakıldığında BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 pozitifliği saptanan 39 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg3 otoantikör titrelerinin ortalaması $166,74 \pm 55,91$ ve BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 pozitifliği saptanamayan 6 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg3 otoantikör titrelerinin ortalaması ise $66,67 \pm 103,28$ olarak hesaplandı. BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 pozitifliği saptanan hastaların otoantikör titreleri, anti-Dsg3 pozitifliği saptanamayanlara göre daha yüksek bulundu, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,063$).

4.2. BP Grubu Verileri

Çalışmaya 16 yeni tanı ve 2 relaps olmak üzere toplam 18 BP hastası dahil edildi. BP hastalarının 13'ü kadın, 5'i erkekti ve yaş aralığı 26-98, yaş ortalaması $60,87 \pm 23,55$ olarak saptandı. Çalışmaya dahil edilen yeni tanı BP hastalarının ortalama hastalık süresi 6,5 ay olarak hesaplandı, relaps hastalarında ise hastalık süresi 3 yıl 10 ay idi. Hastalığın başlangıç yaşı $56,89 \pm 24,07$ ve hastaların ortalama ABSİS değeri $24,78 \pm 20,81$ olarak hesaplandı. Hastaların %50'sinde çalışmaya dahil edildiğinde 10 ve üzerinde bül ve/veya erozyon mevcuttu. Hastaların 2'sinde mukozal tutulum deri

tutulumundan daha fazlaydı, BP hastalarının 3'ünde oral, 2'sinde genital mukoza tutulumu gözlemlendi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. BP ve kontrol grubu hastalarının demografik ve klinik verileri.

Özellik	BP	Kontrol grubu
Cinsiyet		
Kadın	13	17
Erkek	5	18
Yaş ortalaması	60,87±23,55	42,42±16,02
Klinik		
Yeni tanı	16	-
Relaps	2	-
Hastalık süresi ortalaması		
Yeni tanı	6,5 ay	-
Relaps	3 yıl 10 ay	-
ABSIS ortalaması	24,78±20,81	-
Bül ve/veya erozyon sayısı		
0-2 adet	2	-
3-5 adet	1	-
6-10 adet	6	-
10 adet üzeri	9	-
Mukozal tutulum (n)		
Oral	3	-
Nazal	0	-
Konjuktival	0	-
Genital	2	-
Anal	0	-

Bu çalışmaya dahil edilen klinik, histolojik ve immünfloresan ve/veya ELİSA yöntemleriyle BP tanısı konan 18 hastanın 17'sine BİYOÇİP yöntemi ile de aynı tanı konuldu. Kontrol grubundaki 35 hastanın ise iki tanesine BİYOÇİP yöntemi ile BP tanısı konuldu (yanlış pozitiflik %5,7). EUROIMMUN mozaik tabanlı İİF BİYOÇİP yönteminin BP tanısı koymada sensitivitesi ve spesifisitesi sırasıyla %94,4 ve %94,3 olarak saptandı (Çizelge 4.7, Grafik 4.2). BİYOÇİP yöntemi ile BP tanısı konulamayan tek hastanın ELİSA testinde anti-BP180 değeri de negatif olarak saptandı.

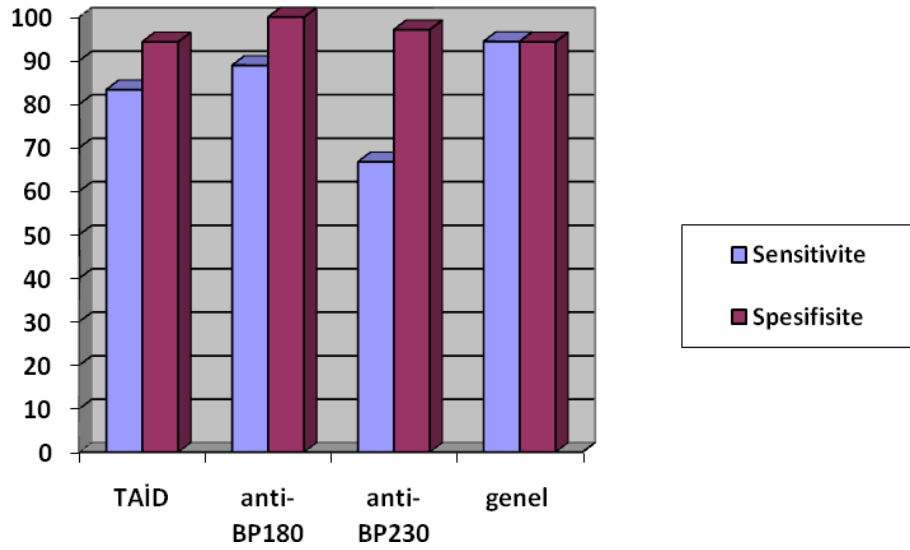
Çizelge 4.7. BP tanısında BİYOÇİP yönteminin değeri.

BİYOÇİP testine göre BP*	Referans yöntemlere göre BP**				Toplam	
	Pozitif	%	Negatif	%	n	%
Pozitif	17	94,4	2	5,7	19	35,8
Negatif	1	5,6	33	94,3	34	64,2
Toplam	18	100,0	35	100,0	53	100,0

* BİYOÇİP yöntemi ile TAİD'de sadece epidermal veya hem epidermal hem de dermal tarafta immünreaktan birikimi ve/veya anti-BP180 ve/veya anti-BP230 otoantikörlerin saptanması olarak tanımlanmıştır.

**DİF'de BMZ'de linner immünreaktan birikimi ve/veya ELİSA testinde anti-BP180 otoantikörlerinin saptanması olarak tanımlanmıştır.

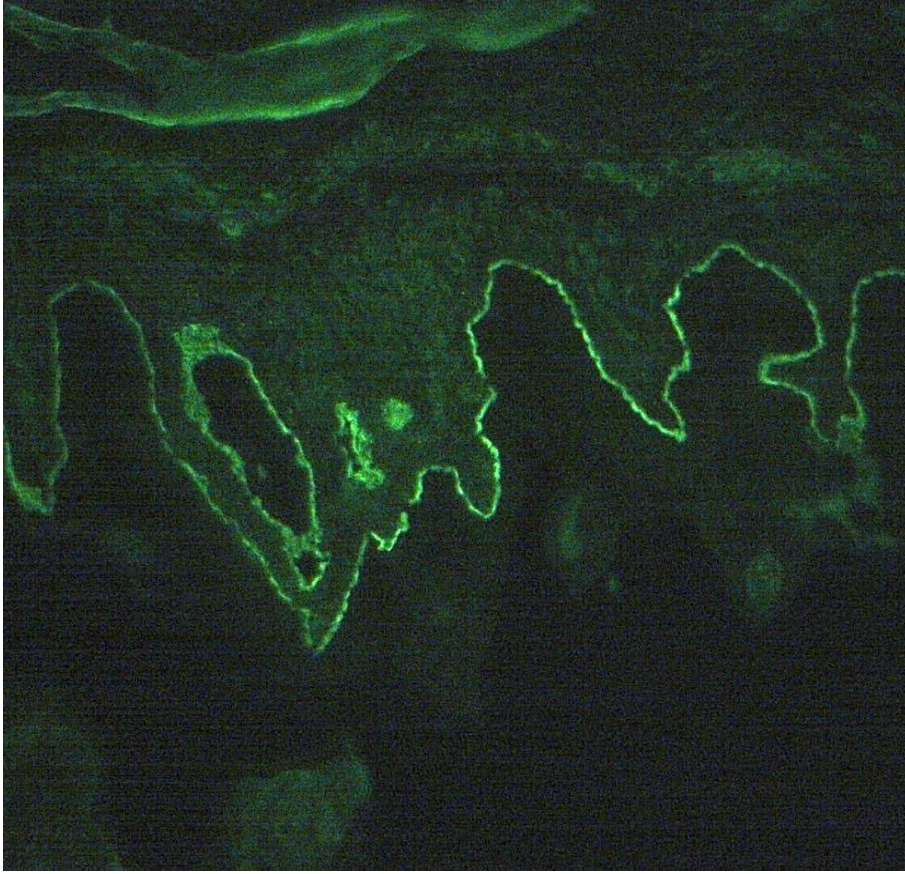
Sensitivite = 0,944; Spesifisite = 0,943



TAİD; BİYOÇİP yöntemi ile TAİD pozitifliği, Anti-BP180; BİYOÇİP yöntemi ile anti-BP180 pozitifliği, Anti-BP230; BİYOÇİP yöntemi anti-BP230 pozitifliği, Genel; BİYOÇİP yöntemi ile TAİD ve/veya anti-BP180 ve/veya anti-BP230 pozitifliği.

Grafik 4.2. BİYOÇİP yönteminin TAİD, anti-BP180 ve anti-BP230 pozitifliği ile BP tanısı koymadaki sensitivite ve spesifisitesi.

BP tanısında altın standart testlerden olan DİF, 18 hastanın 16'sına uygulandı ve hastaların 11 tanesinde DİF'de BMZ boyunca linner immünreaktan depolanması gözlemlendi. Dış merkezde alınan biyopsi sonucu BP ile uyumlu gelip kliniğimize yönlendirilen hastalardan DİF için tekrar biyopsi yapılmayıp ELİSA ile tanı doğrulandığından BP hastalarının 2'sinin DİF tetkiki yapılmadı. BİYOÇİP yöntemindeki TAİD kesitindeki pozitiflik ise 18 hastanın 15'inde saptandı, hastaların hepsinde sadece epidermal depolanma gözlemlendi (Şekil 4.3). Kontrol grubundaki 2 hastada, bioçip yöntemindeki TAİD kesitinde hem dermal hem de epidermal alanda immünreaktan birikimi gözlemlendi. Bu hastalardan birinde anti-BP230 pozitifliği de mevcuttu. BP tanılı hastaların 6 tanesinde BİYOÇİP yönteminde TAİD'e ek olarak özefagus kesitinde BMZ boyunca depolanma gözlemlendi. BP tanısında BİYOÇİP yöntemi ile TAİD'in sensitivitesi %83,3 spesifisitesi %94,3 olarak hesaplandı.



Şekil 4.3. Epidermal lineer BMZ depolanması (*BİYOÇİP_TAİD*, x600).

BP tanısında altın standart testlerden olan ELİSA testi ise BP hastalarının (n:18) ve kontrol grubunun (n:35) tamamına uygulandı, kontrol grubunun tamamında anti-BP180 otoantikorları negatif iken BP hastalarının 15'inde anti-BP180 otoantikor pozitifliği saptandı. BP hastalarının ve kontrol grubunun tamamına uygulanan BİYOÇİP yönteminde ise BP hastalarının 16'sında anti-BP180, 12'sinde anti-BP230 pozitifliği saptandı (Şekil 4.4). BP hastalarında bu yeni testin sensitivitesi ve spesifitesi anti-BP180 otoantikorlarını saptamada sırasıyla %88,9, %100 ve anti-BP230 otoantikorlarını saptamada sırasıyla %66,7, %97,1 olarak saptandı. Anti-BP180 otoantikorlarını saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Çizelge 4.8).



Şekil 4.4. Anti-BP180 pozitifliği (*BİYOÇİP_NC16A.4X, x600*).

Çizelge 4.8. BP ve kontrol grubunda anti-BP180 otoantikorlarını saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yönteminin uyumu.

ELİSA-anti-BP180*	BİYOÇİP-anti-BP180**		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	15	0	15
Negatif	1	37	38
Toplam	16	37	53

* ELİSA testi ile anti-BP180 otoantikorlarının tespiti.

** BİYOÇİP yöntemi ile anti-BP180 otoantikorlarının tespiti.

Agreement = 0,9811; Kappa = 0,691; p < 0,01

5. TARTIŞMA

OBH nadir görülmekle birlikte yaşamı tehdit edebilen veya şiddetli morbiditeye neden olabilen hastalıklar olması nedeni ile deri hastalıkları arasında ayrı bir yere ve öneme sahiptir. Epidermis veya DEB'in yapısal proteinlerine karşı oluşan otoantikorlar ile karakterize olan bu grup hastalıklarda tanıda altın standart söz konusu otoantikorların gösterilmesidir. Bu amaca yönelik metodlar; DİF, İİF, ELİSA, immünopresipitasyon ve immünoblottingdir. Günümüzde ELİSA, büyük ölçüde immünoblotting ve immünopresipitasyon yöntemlerinin yerini almıştır ve rutine girmiştir. Rutinde en sık kullanılan DİF tetkiki, yapılan çalışmalarda oldukça sensitif olarak bildirilmekle beraber uygulanan merkeze göre sensitivitesi değişkenlikler gösterebilmektedir. ELİSA ise tanıda oldukça sensitif ve spesifiktir. Ayrıca en önemli avantajı antikor titresini saptamasıdır. Ancak rutin tanıda kullanılan DİF ve ELİSA pahalı, iş yükü fazla olan ve zaman alıcı testlerdir. Son dönemlerde tanıda DİF ve ELİSA'dan daha ucuz, pratik, standardize ve hızlı yapılabilir bir test elde etmek amacıyla İİF mozaik tabanlı BİYOÇİP yöntemi geliştirilmiştir. BİYOÇİP yönteminde sözü edilen testlere göre sofistike cihazlara veya deneyimli teknisyenlere ihtiyaç duyulmamaktadır. Hasta serumundan farklı dilusyonlarda örnekler hazırlayarak kantitatif değerler elde etmek de mümkündür. Bir BİYOÇİP üzerinde birden fazla antijenik yapının bulunması OBH arasında tek bir serum örneği üzerinden ayırıcı tanı yapma olanağı da sunmaktadır. Dolayısıyla BİYOÇİP yöntemi OBH'nın tanısında tarama testi olarak gelecek vaat etmektedir.

Bu çalışmada pemfigus veya BP tanısında yeni geliştirilmiş olan EUROIMMUNİİF mozaik tabanlı BİYOÇİP yönteminin değerini ortaya koymayı amaçladık. Ayrıca bu grup hastalıkların rutin tanısında altın standart kabul edilen yöntemler ile BİYOÇİP yönteminin uyumlu olup olmadığını da değerlendirdik.

Çalışmamızda, pemfigus tanısını koymada BİYOÇİP yönteminin sensitivitesi %91, spesifitesi %97 olarak saptandı (Bkz. Çizelge 4.2). Pemfigus tanısında BİYOÇİP yönteminin sensitivite ve spesifitesinin araştırıldığı çalışmalar ve sonuçları Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda pemfigus hastalarının 37'sine DİF uygulandı ve hastaların 19 tanesinde İSA pozitifliği saptandı. BİYOÇİP yöntemindeki maymun özefagusu kesitinde İSA pozitifliği ise 45 hastanın 31'inde (%69) saptandı. Pemfigus hastalarında tanıya ulaşma açısından bu iki test arasında tutarlılık gözlenmedi (Bkz. Çizelge 4.3). Van

Beek ve ark.'nın 65 PV ve 50 PF hastasını dahil ettikleri çalışmada BİYOÇİP yöntemi ile özefagus kesitinde İSA pozitifliği 65 PV ve 49 PF serumunda gözlenmiştir (sensitivite sırasıyla %100 ve %98). Çalışmacılar 1:10 ila 1:3200 arasında 6 farklı dilüsyonda BİYOÇİP yöntemini uygulamışlardır (5). Tampoia ve ark. ise 36 PV hastasını dahil ettikleri çalışmada BİYOÇİP yöntemi ile özefagus kesitinde İSA pozitifliğinin pemfigus tanısındaki sensitivitesini %83 olarak bildirmişlerdir(6). Çalışmamızda BİYOÇİP yöntemi ile özefagus kesitinde İSA pozitifliğinin spesifisitesi %100 bulunmuştur. Bu oran, bizden önceki çalışmalarda %89 ve %96 olarak bildirilmiştir (5,6).

Çalışmamızda pemfigus ve kontrol grubunun tamamına uygulanan BİYOÇİP yönteminde pemfigus hastalarının 17'sinde anti-Dsg1 ve 39'unda anti-Dsg3 pozitifliği saptandı. Pemfigus tanısı koymada bu testin sensitivitesi ve spesifisitesi anti-Dsg1 otoantikörlerini saptamada sırasıyla %38 ve %100, anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamada ise sırasıyla %87 ve %97 olarak bulundu. Anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamada, ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Bkz. Çizelge 4.4, Çizelge 4.5). Van Beek ve ark.'nın çalışmasında BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 pozitifliğinin PV ve PF tanısı koymadaki sensitivitesi sırasıyla %52 ve %90, spesifisitesi ise her iki grup için de %100 olarak bildirilmiştir. BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 pozitifliğinin ise PV tanısı koymadaki sensitivitesi ve spesifisitesi ise sırasıyla %98,5 ve %99,6 olarak bildirilmiştir. PV ve PF tanısı koymada BİYOÇİP yöntemi ile elde edilen verilerin, tanıya yönelik diğer yöntemlerin kombine kullanımı ile elde edilen veriler ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında BİYOÇİP yönteminde 1:10 ile 1:3200 arasındaki dilusyonlarda hasta serumlarını çalışmışlar ve hastalık aktivitesi ve ELİSA değerleri ile İF titreleri arasında paralellik bildirmişlerdir (5). Tampoia ve ark.'da benzer şekilde PV tanısı koymada BİYOÇİP yönteminin anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamada sensitivitesinin %100 olduğunu, ancak anti-Dsg1 otoantikörlerinin PV hastalarının az bir kısmının serumunda bulunması ile ilişkili olarak BİYOÇİP yönteminde anti-Dsg1 pozitifliğinin sensitivitesinin düşük (%33) olduğunu belirtmişlerdir. Tampoia ve ark. PV tanısında HEK293 hücrelerinin anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamadaki spesifisitesini ise sırasıyla %98,5 ve %100 olarak bildirmişlerdir. Sonuç olarak anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamada BİYOÇİP yöntemi ile ELİSA testini uyumlu bulmuşlardır (6). Russo ve ark. da PV tanısında BİYOÇİP yönteminin anti-Dsg3 otoantikörlerini

saptamada yüksek sensitivite (%97,6) ve spesifisiteye (%100) sahip olduğunu bildirmişlerdir (Bkz. Çizelge 5.1) (7).

Çizelge 5.1. Pemfigus tanısında BİYOÇİP yönteminin sensitivite ve spesifitesinin araştırıldığı çalışmalar ve sonuçları.

Çalışma	Hastalar	İSA		Anti-Dsg1		Anti-Dsg3	
		Sensitivite	Spesifisite	Sensitivite	Spesifisite	Sensitivite	Spesifisite
Van BEEK ve ark. (5)	PV (n:65) PF (n:50)	%100 %98	-	%52,3 %90	%100 %100	%98,5	%96,6
Tampoia ve ark. (6)	PV (n:36)	%83,3	%95,5	%33,3	%98,5	%100	%100
Russo ve ark. (7)	PV (n:42)	-	-	%19	-	%97,6	%100
Mevcut çalışma	Pemfigus (n:45) [PV (n:39) PF (n:3) PVE (n:1) IgA P. (n:1) PH (n:1)]	%68,9	%100	%37,8	%100	%86,7	%97,1

Çalışmamızda BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 pozitifliği saptanan 17 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg1 otoantikor titrelerinin ortalaması $132,12 \pm 72,79$, BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 pozitifliği saptanmayan 28 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg1 otoantikor titrelerinin ortalaması ise $38,29 \pm 67,06$ olarak hesaplandı. BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg1 pozitifliği saptanan hastaların ELİSA otoantikor titreleri anti-Dsg1 pozitifliği saptanamayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek bulundu ($p < 0,001$). Benzer ilişkiye anti-Dsg3 otoantikorları açısından bakıldığında ise; BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 pozitifliği saptanan 39 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg3 otoantikor titrelerinin ortalaması $166,74 \pm 55,91$, BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 pozitifliği saptanmayan 6 pemfigus hastasının ELİSA testi ile elde edilen anti-Dsg3 otoantikor titrelerinin ortalaması ise $66,67 \pm 103,28$ olarak hesaplandı. Yani anti-Dsg1 de olduğu gibi BİYOÇİP yöntemi ile anti-Dsg3 pozitifliği saptanan hastaların otoantikor titreleri, anti-Dsg3 pozitifliği saptanamayanlara göre daha yüksek bulundu. Ancak ELİSA testindeki anti-Dsg3 otoantikor titreleri ortalamaları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,063$). Bu durum, gruplarda bulunan hasta ve kontrol sayısının yeterli olmamasından kaynaklanabilir. İki ortalama arasındaki fark göz önünde bulundurulduğunda, yeterli hasta ve kontrol grubu sayısına ulaşıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilebilir.

Çalışmamızda BP tanısında BİYOÇİP yönteminin sensitivitesi ve spesifisitesi sırasıyla %94,4 ve %94,3 olarak saptandı (Bkz. Çizelge 4.7). BİYOÇİP yöntemi ile BP tanısı konulamayan ancak DİF'i pozitif olan 1 hastanın ELİSA testinde de anti-BP180 antikoruna negatif olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada BİYOÇİP yöntemiyle TAİD kesitindeki pozitiflik 18 hastanın 15'inde saptandı ve hastaların hepsinde sadece epidermal depolanma gözlemlendi. Kontrol grubundaki 2 hastada ise hem dermal hem de epidermal alanda otoantikor birikimi gözlemlendi. Bu hastalardan birinde anti-BP230 otoantikor pozitifliği de mevcuttu. BP tanılı hastaların 6 tanesinde BİYOÇİP yönteminde TAİD'e ek olarak özefagus kesitinde BMZ boyunca da depolanma gözlemlendi. BP tanısında BİYOÇİP yöntemi ile TAİD'in sensitivitesi %83,3 spesifisitesi %94,3 olarak hesaplandı. Damoiseaux ve ark. 60 BP serumunu 1:10 ve 1:100 dilüsyonlarında çalışmış, TAİD'in sensitivitesini 1/10 ve/veya 1/100 dilüsyonlarda %95 olarak bildirmişler ve pozitifliklerin önemli kısmını %100 dilüsyonda saptanmışlardır (3). Araştırmacılar söz konusu çalışmada iki dilüsyonda çalışarak prozon etkisini azaltmışlardır. Van Beek ve ark. ise 6 farklı dilüsyonda çalışarak yani prozen etkisini daha da azaltarak araştırdıkları anti-BMZ reaktivitesinin sensitivitesini ve spesifisitesini %98,8 olarak daha yüksek bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda sadece 1:10 dilüsyon kullandığımız ve dolayısıyla prozen etkisini yeterli oranda azaltmadığımız için özellikle sensitivitemiz bu iki çalışmaya göre biraz daha düşük saptanmıştır. Ancak tarama testi olarak, 1:10 dilüsyonda uygulanan BİYOÇİP yönteminin elde ettiğimiz sensitivite ve spesifisite değerlerinin (sırasıyla %83,3 ve %94,3) maliyet etkinliği ve harcanan zaman açısından oldukça tatminkar olduğunu söyleyebiliriz.

Bizim çalışmamızda BP hastalarının ve kontrol grubunun tamamına uygulanan BİYOÇİP yönteminde hastaların 16'sında anti-BP180, 12'sinde anti-BP230 otoantikor pozitifliği saptandı. BP hastalarında bu yöntemin sensitivitesi ve spesifitesi anti-BP180 otoantikorlarını saptamada sırasıyla %88,9, %100 ve anti-BP230 otoantikorlarını saptamada sırasıyla %66,7 ve %97,1 olarak saptandı. Anti-BP180 otoantikorlarını saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Bkz. Çizelge 4.8). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında benzer şekilde anti-BP180 otoantikorlarını saptamada BİYOÇİP yönteminin daha sensitif ve spesifik olduğu görülmektedir (Çizelge 5.2). Tüm çalışmalarda BP tanısında BİYOÇİP yönteminde kullanılan TAİD kesiti, BP 230

globüler C-terminal domaini ve rekombinant tetramerik BP180 NC16A substratlarının spesifisitesi %95'in üzerindedir. Haik ve ark. 18 BP hastası ile yaptığı kontrollü çalışmalarında BİYOÇİP yöntemi ile anti-BP180 otoantikorlarını ELİSA kadar yüksek sensitivite ile saptarlarken, anti-BP230 antikorlarını daha düşük sensitivite ile saptamışlardır. Aynı araştırmacılar BİYOÇİP yöntemi ile anti-BP180 otoantikoru saptanamayan 3 BP hastasında ELİSA ile elde edilen otoantikor titrelerinin de düşük olduğunu bildirmişlerdir (4). Bizim çalışmamızda ise BİYOÇİP yöntemi ile anti-BP 180 otoantikorunun saptanamadığı 2 hastada ELİSA da negatif saptanmıştır. Bu sonuçlar düşük titrayonda anti-BP180 ELİSA pozitifliği veya negatifliği durumunda BİYOÇİP yönteminin de sensitivitesinin azalacağını düşündürmektedir.

Çizelge 5.2. BP tanısında BİYOÇİP yönteminin sensitivite ve spesifitesinin araştırıldığı çalışmalar ve sonuçları.

Çalışma	Hastalar	BMZ reaktivitesi (<i>substrat</i>)		Anti-BP180		Anti-BP230	
		Sensitivite	Spesifisite	Sensitivite	Spesifisite	Sensitivite	Spesifisite
Damoiseaux ve ark. (3) (1:10 ve/veya 1:100 dilüsyonda)	BP n:60	%95 (özefagus/TAİD)	-	%88,3	%96,5	%38,3	%98,3
Van BEEK ve ark. (5) (1:10-1:3200 dilüsyonda)	BP n:42	%98,8 (özefagus ve/veya TAİD)	%98,8	%100	%98,2	%54,8	%100
Tampoia ve ark. (6) (1:10 dilüsyonda)	BP n:40	%50 (özefagus)	%100 (Özefagus BMZ)	%90	%100	%30	%100
Haik ve ark. (4)	BP n:18	-	-	%83,3	%100	%39	%100
Mevcut çalışma (1:10 dilüsyonda)	BP n:18	%83,3 (özefagus ve/veya TAİD)	%94,3	%88,9	%100	%66,7	%97,1

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile; hem pemfigus hem de BP tanısında BİYOÇİP yönteminin yüksek sensitivite ve spesifisite ile değerli bir yöntem olduğunu gösterdik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler BİYOÇİP yönteminin OBH'nın tanısında ve ayırıcı tanısında tarama testi olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. Ayrıca çalışmamız, ülkemizde pemphigus ve BP tanısında BİYOÇİP yönteminin değerlendirildiği ilk çalışma olması nedeni ile bu yöntemin Türk toplumunda da kullanılabileceğini göstermesi açısından önemli bir yere sahiptir.

6. SONUÇLAR

- BİYOÇİP yöntemi hem pemfigus hem de BP tanısını koymada oldukça yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip bulundu.
- Pemfigus tanısı koymada BİYOÇİP yönteminde en sensitif substrat Dsg3 aktarılmış HEK293 hücreleri olarak saptandı; bunu sırasıyla maymun özefagusu kesiti ve Dsg1 aktarılmış HEK293 hücreleri izledi.
- Pemfigus grubunda İSA pozitifliğini saptamada DİF ve BİYOÇİP yöntemi arasında tutarlılık gözlenmezken, anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 otoantikörlerini saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu.
- BP tanısı koymada BİYOÇİP yönteminde en sensitif substrat rekombinant tetramerik BP180NC16A olarak saptandı; bunu sırasıyla TAİD ve BP230 globüler C-terminal domain aktarılmış HEK293 hücreleri izledi.
- BP grubunda anti-BP180 otoantikörlerini saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu.

7. ÖZET

İMMÜNFLORESAN MOZAİK TABANLI BİYOÇİP YÖNTEMİNİN PEMFİGUS VE BÜLLÖZ PEMFIGOİD TANISINDA DEĞERİ

Otoimmün büllü hastalıklar (OBH), epidermis veya dermoepidermal bileşkenin yapısal proteinlerine karşı otoantikor gelişimi ile karakterize nadir görülen bir hastalık grubudur. Pemfigus ve büllöz pemfigoid (BP) iki major alt grubunu oluşturur. Tanı sıklıkla klinik, histolojik ve immünfloresan ve/veya ELİSA yöntemleriyle konur. Bu çalışmada bölgemizde klinik, histopatolojik ve immünfloresan ve/veya ELİSA yöntemleri ile pemfigus veya BP tanısı konmuş hastalarda EUROİMMUNİİF mozaik tabanlı BİYOÇİP yöntemini kullanarak, yeni geliştirilmiş bu yöntemin pemfigus ve BP tanısındaki değerini saptamak amaçlanmıştır.

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları polikliniğine başvuran, aktif hastalığı olan 45 pemfigus ve 18 BP olmak üzere toplam 63 hasta, 35 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hastaların hastalık şiddet skorları, immünfloresan bulguları, ELİSA (EUROİMMUN) ile saptanan anti-Dsg1, anti-Dsg3, anti-BP180 otoantikor düzeyleri kaydedildi. Tüm hasta ve sağlıklı serumları BİYOÇİP yöntemi ile çalışıldı elde edilen sonuçlar altın standart kabul edilen tanı yöntemleri ile karşılaştırıldı, geçerlilik için sensitivite ve spesifisite değerleri hesaplandı.

Pemfigus tanısı koymada BİYOÇİP yönteminin sensitivitesi %91,1, spesifisitesi %97,1 olarak saptandı. Anti-Dsg1 ve anti-Dsg3 otoantikorlarını saptamada, ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu ($p<0,01$).

BP tanısı koymada BİYOÇİP yönteminin sensitivitesi ve spesifisitesi sırasıyla %94,4 ve %94,3 olarak saptandı. Anti-BP180 otoantikorlarını saptamada ELİSA ve BİYOÇİP yöntemleri birbirleri ile uyumlu bulundu ($p<0,01$).

Sonuç olarak; BİYOÇİP yöntemi hem pemfigus hem de BP tanısında oldukça yüksek sensitivite ve spesifisite ile daha ucuz, pratik, daha az zamanda uygulanabilen, daha az invazif bir yöntem olarak OBH'nın tanısında ve ayırıcı tanısında tarama testi olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: BİYOÇİP, büllöz pemfigoid, direkt immünofloresan, ELİSA, pemfigus.

8. ABSTRACT

THE VALUE OF BIOCHIP MOSAIC – BASED INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE TECHNIQUE IN THE DIAGNOSIS OF PEMPHIGUS AND BULLOUS PEMPHIGOID

Autoimmune bullous diseases are a group of diseases rarely seen, characterized by autoantibodies against structural proteins of the epidermis or the dermal-epidermal junction. Pemphigus and bullous pemphigoid (BP) are the major groups. The diagnosis is based on generally the combination of clinical features, histopathologic and immunofluorescence findings and/or ELISA test. In this study, our goal was to determine the value of a new method in the diagnosis of pemphigus and BP, by using EUROIMMUN biochip mosaic-based indirect immunofluorescence technique.

A total of 63 patients (45 pemphigus and 18 BP) in active phase of the disease and 35 healthy controls who admitted to Dermatology and Venereology Outpatient Clinic of Akdeniz University School of Medicine were included. The patients ABSIS and/or PDAI scores, immunofluorescence finding, anti-Dsg1, anti-Dsg3, antiBP180 autoantibody titers by ELISA (EUROIMMUN) test were recorded. All patients and controls sera were tested by EUROIMMUN biochip mosaic-based indirect immunofluorescence technique. Biochip technique compared with gold standard diagnostic tests, sensitivity and specificity were calculated for validity.

The sensitivity and specificity of biochip technique in the diagnosis of pemphigus was found 91%, 1 and 97,1%, respectively. In detecting anti-Dsg1 and anti-Dsg3 autoantibodies, a good rate of agreement was observed among biochip technique and ELISA test ($p < 0,01$).

The sensitivity and specificity of biochip technique in the diagnosis of BP was found 94,4% and 94,3%, respectively. In detecting anti-BP180 autoantibodies, a good rate of agreement was observed among biochip technique and ELISA test ($p < 0,01$).

In conclusion; biochip technique in the diagnosis of pemphigus and BP with considerably high sensitivity and specificity has value as a cheaper, practical, less time consuming and minimally invasive test which can be used as an initial screening test in the diagnosis and differential diagnosis of autoimmune bullous diseases.

Key words: Biochip, bullous pemphigoid, direct immunofluorescence, ELISA, pemphigus.

9. KAYNAKLAR

- 1) Amagai M. Vesiculobullous Diseases, Pemphigus. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. Spain Mosby Elsevier 2008; 417-29.
- 2) Borradori L, Bernard P. Vesiculobullous Diseases, Pemphigoid Group. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. Spain Mosby Elsevier 2008; 431-45.
- 3) Damoiseaux J, van Rijsingen M, Warnemünde N, Dähnrich C, Fechner K, Tervaert JW. Autoantibody detection in bullous pemphigoid: clinical evaluation of the EUROPLUS™ *Dermatology Mosaic*. *J Immunol Methods* 2012; 382: 76–80.
- 4) Zarian H, Saponeri A, Michelotto A, Zattra E, Belloni-Fortina A, Alaibac M. Biochip technology for the serological diagnosis of bullous pemphigoid. *ISRN Dermatol* 2012; 237802.
- 5) 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.
- 6) 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: 37–44.
- 7) Russo I, Saponeri A, Peserico A, Alaibac M. The use of biochip immunofluorescence microscopy for the diagnosis of Pemphigus vulgaris. *Acta Histochem* 2014; 116(5): 713-6.
- 8) Grando SA, Grando AA, Glukhenky BT, Doguzov V, Nguyen VT, Holubar K. History and clinical significance of mechanical symptoms in blistering dermatoses: a reappraisal. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(1): 86-92.
- 9) Urbano FL. Nikolsky's sign in autoimmune skin disorders. *Hosp Physician* 2001; 37: 23-4.
- 10) Küçükoglu R, Babuna G. Otoimmün büllöz hastalıkların klinik tanısı. *Türkderm* 2011; 45(1): 16-25.
- 11) Uzun S, Durdu M. The specificity and sensitivity of Nikolskiy sign in the diagnosis of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(3): 411-5.

- 12) Bystryn JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet* 2005; 366(9479): 61-73.
- 13) Lever WF. Historical perspective of bullous pemphigoid. *Clin Dermatol* 1987; 5(1): 1-5.
- 14) Beutner E, Jordon R. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964; 117: 505-10.
- 15) Beutner EH, Lever Wf, Witebsky E, Jordon R, Chertock B. Autoantibodies in pemphigus vulgaris: response to an intercellular substance of epidermis. *JAMA* 1965; 192: 682-8.
- 16) Ide A, Hashimoto T, Amagai M, Tanaka M, Nishikawa T. Detection of autoantibodies against bullous pemphigoid and pemphigus antigens by an enzyme-linked immunosorbent assay using the bacterial recombinant proteins. *Exp Dermatol* 1995; 4(2): 112-6.
- 17) Lever WF. Pemphigus. *Medicine (Baltimore)* 1953; 32(1): 1-123.
- 18) Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS. The new pemphigus variants. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 649-71.
- 19) Di Zenzo G, Della Torre R, Zambruno G, Borradori L. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. *Clin Dermatol* 2012; 30(1): 3-16.
- 20) 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): 405-14.
- 21) Feliciani C, Joly P, Jonkman MF, Zambruno G, Zillikens D, Ioannides D, et al. Management of bullous pemphigoid: the European Dermatology Forum consensus in collaboration with the European Academy of Dermatology and Venereology. *Br J Dermatol* 2015; 172(4): 867-77.
- 22) Karıncaoğlu Y. Pemfigus: epidemiyoloji ve patogenezi. *Turkderm* 2008; 42 (Özel sayı 1): 1-4.
- 23) Kitajima Y. Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus. *Arch Dermatol Res* 2003; 295 (Suppl 1): 17-23.

- 24) Uzun S, Durdu M, Akman A, Gunasti S, Uslular C, Memisoglu HR ve ark. Pemphigus in the Mediterranean region of Turkey: a study of 148 cases. *Int J Dermatol* 2006; 45(5): 523-8.
- 25) Marazza G, Pham HC, Schärer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trüeb RM, Hohl D, Itin P, Lautenschlager S, Naldi L, Borradori L; Autoimmune bullous disease Swiss study group. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol* 2009;161(4): 861-8.
- 26) Bertram F, Bröcker EB, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7(5): 434-40.
- 27) Alpsoy E, Akman-Karakas A, Uzun S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 2015 Jan 15. [Epub ahead of print].
- 28) Thivolet J, Jablonska S. Bullous disorders: from histology to molecular biology. *Clin Dermatol* 2001; 19(5): 538-43.
- 29) Simon DG, Krutchkoff D, Kaslow RA, Zarbo R. Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972 to 1977. *Arch Dermatol* 1980; 116: 1035-7.
- 30) Aboobaker J, Morar N, Ramdial PK, Hammond MG. Pemphigus in South Africa. *Int J Dermatol* 2001; 40(2): 115-9.
- 31) Joly P, Litrowski N. Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clin Dermatol* 2011; 29(4): 432-6.
- 32) Vaillant L. Bullous autoimmune diseases of the oral mucosa. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1999; 100(5): 230-9.
- 33) Scully C, Challacombe SJ. Pemphigus vulgaris: update on etiopathogenesis, oral manifestations, and management. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(5): 397-408.
- 34) Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev* 2014; 13(4-5): 477-81.
- 35) Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V et al. Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol* 1999; 113(1): 107-10.
- 36) 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 USA* 1991; 88(11): 5056-60.

- 37) Loiseau P, Lecleach L, Prost C, Lepage V, Busson M, Bastuji-Garin S et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun* 2000; 15(1): 67-73.
- 38) Koc CK, Sallakci N, Akman-Karakaş 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): 53-8.
- 39) Sinha AA. The genetics of pemphigus. *Dermatol Clin* 2011; 29(3): 381-91.
- 40) 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): 374-81.
- 41) Ruocco V, Peluso G, Pisani M. Pemphigus vulgaris in only one of two monozygotic twins. *J Am Acad Dermatol* 1985; 12(3): 587-9.
- 42) Revenga-Arranz F, Martínez-Lasso J, Vanaclocha-Sebastián F. Pemphigus vulgaris in two MHC-haploidentical brothers. *Dermatology* 1996; 193(1): 71-2.
- 43) Mignogna MD, Fortuna G, Leuci S. Oral pemphigus. *Minerva Stomatol* 2009; 58(10): 501-18.
- 44) Katzenelson V, David M, Zamir R, Mellibovsky J, Idises C, Sandbank M. Familial pemphigus vulgaris. *Dermatologica* 1990; 181(1): 48-50.
- 45) 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): 470-6.
- 46) 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): 657-69.
- 47) Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med* 1989; 320(22): 1463-9.
- 48) Loiseau P, Lecleach L, Prost C, Lepage V, Busson M, Bastuji-Garin S, et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun* 2000; 15(1): 67-73.
- 49) Moraes JR, Moraes ME, Fernandez-Vina M, Diaz LA, Friedman H, Campbell IT, et al. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. *Immunogenetics* 1991; 33(5-6): 388-91.

- 50) Warren SJ, Arteaga LA, Rivitti EA, Aoki V, Hans-Filho G, Qaqish BF, et al. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 2003; 120(1): 104-8.
- 51) Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; 9(10): 844-56.
- 52) Jablonska S, Chorzelski TP, Beutner EH, Chorzelska J. Herpetiform pemphigus, a variable pattern of pemphigus. *Int J Dermatol* 1975; 14(5): 353-9.
- 53) Wallach D, Foldès C, Cottenot F. Subcorneal pustulosis, superficial acantholysis and monoclonal IgA. *Ann Dermatol Venereol* 1982; 109(11): 959-63.
- 54) 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): 1729-35.
- 55) Baican A, Baican C, Chiriac G, Chiriac MT, Macovei V, Zillikens D, et al. Pemphigus vulgaris is the most common autoimmune bullous disease in Northwestern Romania. *Int J Dermatol* 2010; 49: 768-74.
- 56) Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; 337: 160-63.
- 57) Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bédane C, Duvert-Lehembre S, et al. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol* 2012; 132(8): 1998-2004.
- 58) Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *Lancet* 2013; 381(9863): 320-32.
- 59) Trüeb RM, Didierjean L, Fellas A, Elias A, Borradori L. Childhood bullous pemphigoid: report of a case with characterization of the targeted antigens. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40(2 Pt 2): 338-44.
- 60) Patrício P, Ferreira C, Gomes MM, Filipe P. Autoimmune bullous dermatoses: a review. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 203-10.
- 61) Bertram F, Bröcker EB, Zillikens D, Schmidt E: Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7: 434-40.
- 62) Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B: Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population based study on incidence. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 266-8.

- 63) Delgado JC, Turbay D, Yunis EJ, Yunis JJ, Morton ED, Bhol K, et al. A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(16): 8569-71.
- 64) Stanley JR, Amagai M. Autoimmune bullous diseases: historical perspectives. *J Invest Dermatol* 2008; 128(E3): E16-8.
- 65) Hertl M. Pemphigus. In: Hertl M, editor. *Autoimmune Diseases of the Skin*. 2nd ed. Wien, New York: Springer 2005; 45-69.
- 66) Bystryń JC. Interpretation of immunofluorescence test in dermatology. *Prog Dermatol* 1985; 19: 1-8.
- 67) Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev* 2010; 10(2): 84-9.
- 68) 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): 1189-96.
- 69) Wasserstrum N, Laros RK. Transplacental transmission of pemphigus. *Jr JAMA* 1983; 249(11): 1480-2.
- 70) Ibrahim SB, Yashodhara BM, Umakanth S, Kanagasabai S. Pemphigus vulgaris in a pregnant woman and her neonate. *BMJ Case Rep* 2012; 2012.
- 71) Gushi M, Yamamoto Y, Mine Y, Awazawa R, Nonaka K, Taira K, et al. Neonatal pemphigus vulgaris. *J Dermatol* 2008; 35(8): 529-35.
- 72) Uzun S. Pemfigusun Güncel Tedavisi ve Yönetimi. *Turk J Dermatol* 2012; 6: 91-101.
- 73) Hacker MK, Janson M, Fairley JA, Lin MS. Isotypes and antigenic profiles of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies. *Clin Immunol* 2002; 105(1): 64-74.
- 74) Amagai M. Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *J Dermatol Sci* 1999; 20(2): 92-102.
- 75) Ding X, Diaz LA, Fairley JA, Giudice GJ, Liu Z. The anti-desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris sera are pathogenic. *J Invest Dermatol* 1999; 112(5): 739-43.
- 76) Buxton RS, Cowin P, Franke WW, Garrod DR, Green KJ, King IA, et al. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 1993; 121(3): 481-3.

- 77) Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, Stanley JR. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 1996; 106(2): 351-5.
- 78) Shimizu H, Masunaga T, Ishiko A, Kikuchi A, Hashimoto T, Nishikawa T. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera show an inversely graded binding pattern to extracellular regions of desmosomes in different layers of human epidermis. *J Invest Dermatol* 1995; 105(2): 153-9.
- 79) 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; 459-74.
- 80) Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 2003; 113(2): 249-60.
- 81) Mao X, Nagler AR, Farber SA, Choi EJ, Jackson LH, Leiferman KM, et al. Autoimmunity to desmocollin 3 in pemphigus vulgaris. *Am J Pathol* 2010; 177(6): 2724-30.
- 82) Vu TN, Lee TX, Ndoeye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Dahl MV, et al. The pathophysiological significance of nondesmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptors in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol* 1998; 134(8): 971-80.
- 83) Nguyen VT, Ndoeye A, Grando SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem* 2000; 275(38): 29466-76.
- 84) Nguyen VT, Ndoeye A, Grando SA. Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 2000; 157(4): 1377-91.
- 85) Aktan Ş. Otoimmün Büllöz Hastalıkların Etyopatogenezi. *Türkderm* 2011; 45(1): 8-15.
- 86) Lanza A, Cirillo N, Femiano F, Gombos F. How does acantholysis occur in pemphigus vulgaris: a critical review. *J Cutan Pathol* 2006; 33(6): 401-12.

- 87) 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): 167-70.
- 88) 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): 461-8.
- 89) Futei Y, Amagai M, Sekiguchi M, Nishifuji K, Fujii Y, Nishikawa T. Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2000; 115(5): 829-34.
- 90) Grando SA, Bystryń JC, Chernyavsky AI, Frusć-Zlotkin M, Gniadecki R, Lotti R, et al. Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis. *Exp Dermatol* 2009; 18(9): 764-70.
- 91) Bystryń JC, Grando S. The cause of acantholysis in pemphigus: further support for the 'basal cell shrinkage' hypothesis. *Br J Dermatol* 2009; 161(3): 702.
- 92) Ruocco E, Aurilia A, Ruocco V. Precautions and suggestions for pemphigus patients. *Dermatology* 2001; 203(3): 201-7.
- 93) Brenner S, Bialy-Golan A, Ruocco V. Drug-induced pemphigus. *Clin Dermatol* 1998; 16(3): 393-7.
- 94) Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M. 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): 635-42.
- 95) Sinha AA. The genetics of pemphigus. *Dermatol Clin* 2011; 29(3): 381-91.
- 96) Hertl M, Eming R, Veldman C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *J Clin Invest* 2006; 116(5): 1159-66.
- 97) Sticherling M, Erfurt-Berge C. Autoimmune blistering diseases of the skin. *Autoimmun Rev* 2012; 11(3): 226-30.
- 98) Kricheli D, David M, Frusć-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, et al. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. *Br J Dermatol* 2000; 143(2): 337-42.

- 99) Warren SJ, Arteaga LA, Rivitti EA, Aoki V, Hans-Filho G, Qaqish BF, et al. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 2003; 120(1): 104-8.
- 100) Nagel A, Lang A, Engel D, Podstawa E, Hunzelmann N, de Pita O, et al. Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE antibodies against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2010; 134: 320-30.
- 101) Schepens I, Jaunin F, Begre N, Läderach U, Marcus K, Hashimoto T, et al. The protease inhibitor alpha-2-macroglobulin-like-1 is the p170 antigen recognized by paraneoplastic pemphigus autoantibodies in human. *PLoS One* 2010; 5(8): e12250.
- 102) 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.
- 103) Zhu X, Zhang B. Paraneoplastic pemphigus. *J Dermatol* 2007; 34(8): 503-11.
- 104) 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): 829-34.
- 105) Amagai M, Nishikawa T, Nousari HC, Anhalt GJ, Hashimoto T. Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice. *J Clin Invest* 1998; 102(4): 775-82.
- 106) Megahed M. Histopathology of blistering diseases with clinical, electron microscopic, immunological and molecular biological correlations. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2004; 49-153.
- 107) Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; 9(11): 927-47.
- 108) Brenner S, Bialy-Golan A, Ruocco V. Drug-induced pemphigus. *Clin Dermatol* 1998; 16(3): 393-7.
- 109) Ruocco V, De Angelis E, Lombardi ML. Drug-induced pemphigus. II. Pathomechanisms and experimental investigations. *Clin Dermatol* 1993; 11(4): 507-13.
- 110) Brenner S, Wolf R, Ruocco V. Contact pemphigus: a subgroup of induced pemphigus. *Int J Dermatol* 1994; 33(12): 843-5.

- 111) Vozza A, Ruocco V, Brenner S, Wolf R. Contact pemphigus. *Int J Dermatol* 1996; 35(3): 199-201.
- 112) Ruocco V, Ruocco E. Pemphigus and environmental factors. *G Ital Dermatol Venerol* 2003; 138: 299-309.
- 113) Valikhani M, Kavusi S, Chams-Davatchi C, Daneshpazhooh M, Barzegari M, Ghiasi M, et al. Pemphigus and associated environmental factors: a case-control study. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32(3): 256-60.
- 114) 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.
- 115) Brenner S, Ruocco V, Ruocco E, Russo A, Tur E, Luongo V, Lombardi ML. In vitro tannin acantholysis. *Int J Dermatol* 2000; 39(10): 738-42.
- 116) Feliciani C, Ruocco E, Zampetti A, Toto P, Amerio P, Tulli A, et al. Tannic acid induces in vitro acantholysis of keratinocytes via IL-1 α and TNF- α . *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20(2): 289-99.
- 117) Diaz LA, Rathe H 3rd, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ, et al. Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 1990; 86(4): 1088-94.
- 118) Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 1981; 24(3): 897-903.
- 119) Liu Z, Giudice GJ, Zhou X, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, et al. A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1997; 100(5): 1256-63.
- 120) Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993; 92(5): 2480-8.
- 121) Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 33(1-2): 67-77.

- 122) Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, Hamada T, Karashima T, Nakama T, et al. Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 2011; 20(12): 1022-4.
- 123) Schulze F, Kasperkiewicz M, Zillikens D, Schmidt E. Bullous pemphigoid. *Hautarzt* 2013; 64(12): 931-43.
- 124) Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, Mariotti F, De Pità O, Owaribe K, et al. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *J Invest Dermatol* 2004; 122(1): 103-10.
- 125) Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu SL, Bröcker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal–epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 664–71.
- 126) Iwata Y, Komura K, Kodera M, Usuda T, Yokoyama Y, Hara T, et al. Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2008; 144(1): 41-8.
- 127) Delaporte E, Dubost-Brama A, Ghohestani R, Nicolas JF, Neyrinck JL, Bergoend H, et al. IgE autoantibodies directed against the major bullous pemphigoid antigen in patients with a severe form of pemphigoid. *J Immunol* 1996; 157(8): 3642-7.
- 128) Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42(4): 577-83.
- 129) Christophoridis S, Büdinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *Br J Dermatol* 2000; 143(2): 349-55.
- 130) Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, et al. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun* 2000; 15(3): 293-300.
- 131) Ujiie H, Shibaki A, Nishie W, Shinkuma S, Moriuchi R, Qiao H, et al. Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4+ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model. *Clin Immunol* 2012; 142(2): 167-75.

- 132) Büdinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H, et al. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 1998; 102(12): 2082-9.
- 133) Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Fontao L, Calabresi V, Hofmann SC, Hellmark T, et al. Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol* 2008; 128(3): 415-26.
- 134) Venning VA, Wojnarowska F. Induced bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 1995; 132(5): 831-2.
- 135) Walmsley N, Hampton P. Bullous pemphigoid triggered by swine flu vaccination: case report and review of vaccine triggered pemphigoid. *J Dermatol Case Rep* 2011; 5(4): 74-6.
- 136) Lo Schiavo A, Ruocco E, Brancaccio G, Caccavale S, Ruocco V, Wolf R. Bullous pemphigoid: etiology, pathogenesis, and inducing factors: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2013; 31(4): 391-9.
- 137) Lee JJ, Downham TF 2nd: Furosemide-induced bullous pemphigoid. case report and review of literature. *J Drugs Dermatol* 2006; 5: 562-4.
- 138) Bastuji-Garin S, Joly P, Picard-Dahan C, Bernard P, Vaillant L, Pauwels C, et al. Drugs associated with bullous pemphigoid. A case-control study. *Arch Dermatol* 1996; 132(3): 272-6.
- 139) Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, et al; French Study Group for Bullous Diseases. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol* 2011; 131(3): 637-43.
- 140) Vassileva S. Drug-induced pemphigoid: bullous and cicatricial. *Clin Dermatol* 1998; 16(3): 379-87.
- 141) Fedeles F, Murphy M, Rothe MJ, Grant-Kels JM. Nutrition and bullous skin diseases. *Clin Dermatol* 2010; 28(6): 627-43.
- 142) 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): 159-61.

- 143) Shamim T, Varghese VI, Shameena PM, Sudha S. Pemphigus vulgaris in oral cavity: clinical analysis of 71 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13(10): E622-6.
- 144) Ishii N, Maeyama Y, Karashima T, Nakama T, Kusuhara M, Yasumoto S, 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): 641-3.
- 145) Meurer M, Millns JL, Rogers RS 3rd, Jordon RE. Oral pemphigus vulgaris. A report of ten cases. *Arch Dermatol* 1977; 113(11): 1520-4.
- 146) Ben Lagha N, Poulesquen V, Roujeau JC, Alantar A, Maman L. Pemphigus vulgaris: a case-based update. *J Can Dent Assoc* 2005; 71(9): 667-72.
- 147) Ioannides D, Lazaridou E, Rigopoulos D. Pemphigus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22(12): 1478-96.
- 148) Rivera Diaz R, Alonso Llamazares J, Rodriguez Peralto JL, Sebastian Vanaclocha F, Iglesias Diez L. Nail involvement in pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol* 1996; 35(8): 581-2.
- 149) Berker DD, Dalziel K, Dawber RP, Wojnarowska F. Pemphigus associated with nail dystrophy. *Br J Dermatol* 1993; 129(4): 461-4.
- 150) Lee HE, Wong WR, Lee MC, Hong HS. Acute paronychia heralding the exacerbation of pemphigus vulgaris. *Int J Clin Pract* 2004; 58(12): 1174-6.
- 151) Kim BS, Song KY, Youn JI, Chung JH. Paronychia--a manifestation of pemphigus vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 1996; 21(4): 315-7.
- 152) Hale EK, Bystryn JC. Laryngeal and nasal involvement in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44(4): 609-11.
- 153) Zillikens D. Autoimmune Bullous Diseases. Ed. Braun-Falco O, Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M. Braun-Falco's Dermatology. 3th ed, Italy: Springer 2009; 641-68.
- 154) Landau M, Brenner S. Histopathologic findings in drug-induced pemphigus. *Am J Dermatopathol* 1997; 19(4): 411-4.
- 155) 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): 919-23.
- 156) Ruocco V, Pisani M: Induced pemphigus. *Arch Dermatol Res* 1982; 274: 123-40.

- 157) 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): 553-62.
- 158) Kimyai-Asadi A, Jih MH. Paraneoplastic pemphigus. *Int J Dermatol* 2001; 40(6): 367-72.
- 159) Wang J, Zhu X, Li R, Tu P, Wang R, Zhang L, et al. Paraneoplastic pemphigus associated with Castleman tumor: a commonly reported subtype of paraneoplastic pemphigus in China. *Arch Dermatol* 2005; 141(10): 1285-93.
- 160) Camisa C, Helm TN. Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasia-induced autoimmune disease. *Arch Dermatol* 1993; 129(7): 883-6.
- 161) Di Zenzo G, Marazza G, Borradori L. Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol* 2007; 23: 257-88.
- 162) Asbrink E, Hovmark A: Clinical variations in bullous pemphigoid with respect to early symptoms. *Acta Derm Venereol* 1981; 61: 417-21.
- 163) Stanley JR. Bullous pemphigoid. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Loffell DJ, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed. Vol. 1. United States of America: McGraw-Hill 2007; 475-80.
- 164) Schmidt E, della Torre R, Borradori L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin* 2011; 29(3): 427-38.
- 165) Murrell DF, Daniel BS, Joly P, Borradori L, Amagai M, Hashimoto T, et al. Definitions and outcome measures for bullous pemphigoid: recommendations by an international panel of experts. *J Am Acad Dermatol* 2012; 66(3): 479-85.
- 166) Ruocco E, Brunetti G, Del Vecchio M, Ruocco V. The practical use of cytology for diagnosis in dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 125–9.
- 167) Ruocco V, Coscia-Porrazzi L, Pisani M. Reliability of cytodagnosis in oral pemphigus vulgaris. A study of 30 cases. *J Dermatol* 1984; 11(6): 535-40.
- 168) Blank H, Burgoon CF. Abnormal cytology of epithelial cells in pemphigus vulgaris; a diagnostic aid. *J Invest Dermatol* 1952; 18(3): 213-23.
- 169) Gupta LK, Singhi MK. Tzanck smear: a useful diagnostic tool. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005; 71(4): 295-9.
- 170) Verma KK, Khaitan BK, Singh MK. Antibody deposits in Tzanck smears in pemphigus vulgaris. *J Cutan Pathol* 1993; 20(4): 317-9.

- 171) Ruocco V, Ruocco E: Tzanck smear, an old test for the new millennium: when and how. *Int J Dermatol* 1999; 38: 830-4.
- 172) Wu H, Schapiro B, Harrist TJ: Noninfectious vesiculobullous and vesiculopustular diseases. In: Elder D, Elenitsas R, Jhonson Jr BL, Murphy GF, editors. *Histopathology of the skin*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins 2005; 243-91.
- 173) Radoš J. Autoimmune blistering diseases: histologic meaning. *Clin Dermatol* 2011; 29(4): 377-88.
- 174) Erkin G. Otoimmün Büllöz Hastalıkların Histopatolojik Tanısı. *Türkderm* 2011; 45(1): 26-30.
- 175) Pfaltz K, Mertz K, Rose C, Scheidegger P, Pfaltz M, Kempf W. C3d immunohistochemistry on formalin-fixed tissue is a valuable tool in the diagnosis of bullous pemphigoid of the skin. *J Cutan Pathol* 2010; 37(6): 654-8.
- 176) Uzun S. Dermatolojide immünofloresan teknikler. In: Acar MA, Yücel A, Uzun S, Aksungur VL, Özpoyraz M, editörler. *Deri Sorunlarında Adım Adım Tanısal Yaklaşımlar*. İstanbul: Mart Matbaacılık 2006; 98-100.
- 177) Mutasim DF, Adams BB: Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 803-22.
- 178) Helander SD, Rogers RS 3rd. The sensitivity and specificity of direct immunofluorescence testing in disorders of mucous membranes. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30(1): 65-75.
- 179) Schaerer L, Trüeb RM. Direct immunofluorescence of plucked hair in pemphigus. *Arch Dermatol* 2003; 139(2): 228-9.
- 180) Daneshpazhooh M, Asgari M, Naraghi ZS, Barzgar MR, Akhyani M, Balighi K, et al. A study on plucked hair as a substrate for direct immunofluorescence in pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(2): 129-31.
- 181) Rao R, Dasari K, Shenoi S, Balachandran C. Demonstration of pemphigus-specific immunofluorescence pattern by direct immunofluorescence of plucked hair. *Int J Dermatol* 2009; 48(11): 1187-9.
- 182) Beutner EH, Lever WF, Witebsky E, Jordon R, Chertock B. Autoantibodies in pemphigus vulgaris: response to an intercellular substance of epidermis. *JAMA* 1965; 192: 682-8.

- 183) Bystryń JC, Abel E, DeFeo C. Pemphigus foliaceus. Subcorneal intercellular antibodies of unique specificity. *Arch Dermatol* 1974; 110(6): 857-61.
- 184) 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): 605-8.
- 185) Schmidt E, Zillikens D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev* 2010; 10(2): 84-9.
- 186) Vodegel RM, Jonkman MF, Pas HH, de Jong MC. U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol* 2004; 151(1): 112-8.
- 187) De Jong MC, Bruins S, Heeres K, Jonkman MF, Nieboer C, Boorsma DM, et al. Bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. Differentiation by fluorescence overlay antigen mapping. *Arch Dermatol* 1996; 132(2): 151-7.
- 188) Jiao D, Bystryń JC. Sensitivity of indirect immunofluorescence, substrate specificity, and immunoblotting in the diagnosis of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37(2 Pt 1): 211-6.
- 189) Harman KE. New laboratory techniques for the assessment of acquired immunobullous disorders. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27(1): 40-6.
- 190) Uzun S. Otoimmün Büllöz Hastalıkların Tanısında İmmüno Floresan Bulgular. *Türkderm* 2011; 45(1): 31-35.
- 191) Sabolinski ML, Beutner EH, Krasny S, Kumar V, Huang J, Chorzelski TP, et al. Substrate specificity of anti-epithelial antibodies of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera in immunofluorescence tests on monkey and guinea pig esophagus sections. *J Invest Dermatol* 1987; 88(5): 545-9.
- 192) Helou J, Allbritton J, Anhalt GJ. Accuracy of indirect immunofluorescence testing in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32(3): 441-7.
- 193) Wallach D. Intraepidermal IgA pustulosis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27(6 Pt 1): 993-1000.
- 194) Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO 3rd, Queen LL, Wheeler CE. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol* 1984; 82(2): 139-44.

- 195) Zillikens D. Diagnosis of autoimmune bullous skin diseases. *Clin Lab* 2008; 54(11-12): 491-503.
- 196) Kelly SE, Wojnarowska F. The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 1988; 118(1): 31-40.
- 197) Gammon WR, Kowalewski C, Chorzelski TP, Kumar V, Briggaman RA, Beutner EH. Direct immunofluorescence studies of sodium chloride-separated skin in the differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22(4): 664-70.
- 198) Atzori L, Deidda S, Aste N. Enzyme-linked immunosorbent assay in autoimmune blistering diseases: preliminary experience of the Dermatology Department of Cagliari. *G Ital Dermatol Venereol* 2008; 143(1): 1-8.
- 199) 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): 121-6.
- 200) 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): 236-40.
- 201) Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol* 2010; 19(5): 458-63.
- 202) 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): 351-7.
- 203) Ng PP, Thng ST, Mohamed K, Tan SH. Comparison of desmoglein ELISA and indirect immunofluorescence using two substrates (monkey oesophagus and normal human skin) in the diagnosis of pemphigus. *Australas J Dermatol* 2005; 46(4): 239-41.

- 204) Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, et al. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997; 159(4): 2010-7.
- 205) 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): 775-80.
- 206) Hallaji Z, Mortazavi H, Lajevardi V, Tamizifar B, AmirZargar A, Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C. 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): 275-80.
- 207) Akman A, Uzun S, Alpsoy E. Immunopathologic features of pemphigus in the east Mediterranean region of Turkey: a prospective study. *Skinmed* 2010; 8(1): 12-6.
- 208) Abasq C, Mouquet H, Gilbert D, Tron F, Grassi V, Musette P, et al. ELISA testing of anti-desmoglein 1 and 3 antibodies in the management of pemphigus. *Arch Dermatol* 2009; 145(5): 529-35.
- 209) Probst C, Schlumberger W, Stöcker W, Recke A, Schmidt E, Hashimoto T, et al. Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus. *Clin Chim Acta* 2009; 410(1-2): 13-8.
- 210) Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P, et al. BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2004; 122(6): 1413-22.
- 211) Yoshida M, Hamada T, Amagai M, Hashimoto K, Uehara R, Yamaguchi K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2006; 41(1): 21-30.
- 212) Sitaru C, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol* 2007; 16(9): 770-7.
- 213) Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a

- diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2002; 30(3): 224-32.
- 214) Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2000; 136(2): 174-8.
 - 215) Haase C, Büdinger L, Borradori L, Yee C, Merk HF, Yancey K, et al. Detection of IgG autoantibodies in the sera of patients with bullous and gestational pemphigoid: ELISA studies utilizing a baculovirus-encoded form of bullous pemphigoid antigen 2. *J Invest Dermatol* 1998; 110(3): 282-6.
 - 216) Kromminga A, Sitaru C, Hagel C, Herzog S, Zillikens D. Development of an ELISA for the detection of autoantibodies to BP230. *Clin Immunol* 2004; 111(1): 146-52.
 - 217) Feliciani C, Caldarola G, Kneisel A, Podstawa E, Pfütze M, Pfützner W, et al. IgG autoantibody reactivity against bullous pemphigoid (BP) 180 and BP230 in elderly patients with pruritic dermatoses. *Br J Dermatol* 2009; 161(2): 306-12.
 - 218) 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): 1016-24.
 - 219) Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, Chorzelski TP, Bhogal BS, Black MM, Stevens HP, Boorsma DM, Korman NJ, Gamou S, et al. Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 1995; 104(5): 829-34.
 - 220) Kiss M, Husz S, Molnár K, Dobozy A. Identification of different circulating autoantibodies in patients with bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by means of immunoblotting. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1996; 43(2-3): 115-23.
 - 221) Ishiko A, Shimizu H. Electron microscopy in diagnosis of autoimmune bullous disorders. *Clin Dermatol* 2001; 19(5): 631-7.
 - 222) 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): 903-8.
 - 223) Martin LK, Werth V, Villanueva E, Segall J, Murrell DF. Interventions for pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (1):CD006263.

- 224) Bystryn JC. Adjuvant therapy of pemphigus. *Arch Dermatol* 1984; 120(7): 941-51.
- 225) Lever WF, Schaumburg-Lever G. Treatment of pemphigus vulgaris. Results obtained in 84 patients between 1961 and 1982. *Arch Dermatol* 1984; 120(1): 44-7.
- 226) Kanwar AJ, Dhar S. Factors responsible for death in patients with pemphigus. *J Dermatol* 1994; 21(9): 655-9.
- 227) Reguiat Z, Tabary T, Maizières M, Bernard P. Rituximab treatment of severe pemphigus: long-term results including immunologic follow-up. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67(4): 623-9.
- 230) Mignogna MD, Fortuna G, Leuci S, Adamo D, Dell'Aversana Orabona G, Ruoppo E, et al. Adjuvant triamcinolone acetonide injections in oro-pharyngeal pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 1157-65.
- 231) Daneshpazhooh M, Naraghi ZS, Ramezani A, Ghanadan A, Esmaili N, Chams-Davatchi C. Direct immunofluorescence of plucked hair for evaluation of immunologic remission in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65(6): e173-7.
- 232) Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E, et al; Bullous Diseases French Study Group. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 2002; 346(5): 321-7.
- 233) Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Delaporte E, D'Incan M, Dreno B, et al. A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study. *J Invest Dermatol* 2009; 129(7): 1681-7.
- 234) Morel P, Guillaume JC. Treatment of bullous pemphigoid with prednisolone only: 0.75 mg/kg/day versus 1.25 mg/kg/day. A multicenter randomized study. *Ann Dermatol Venereol* 1984; 111(10): 925-8.
- 235) Sebaratnam DF, Murrell DF. Objective scoring systems for disease activity in autoimmune bullous disease. *Dermatol Clin* 2011; 29(3): 515-20.
- 236) Dehen L, Crickx B, Grossin M, Belaïch S. Comparative study of the development and prognosis of pemphigus vulgaris and seborrheic pemphigus. *Ann Dermatol Venereol* 1993; 120(12): 874-8.

- 237) Haouet H, Ben Hamida A, Haouet S, Chaffai M, Ben Osman A. Tunisian pemphigus. Apropos of 70 cases. (Experience of the dermatology department of La Rabta Hospital 1974-1992). *Ann Dermatol Venereol* 1996; 123(1): 9-11.
- 238) Park SG, Chang JY, Cho YH, Kim SC, Lee MG. Transition from pemphigus foliaceus to pemphigus vulgaris: case report with literature review. *Yonsei Med J* 2006; 47(2): 278-81.
- 239) Noursari HC, Deterding R, Wojtczak H, Aho S, Uitto J, Hashimoto T, et al. The mechanism of respiratory failure in paraneoplastic pemphigus. *N Engl J Med* 1999; 340(18): 1406-10.
- 240) Pitoia F, Moncet D, Glorio R, Graciela Diaz A, Rodriguez Costa G, Carbia S, et al. Prevalence of thyroid autoimmunity in patients with pemphigus vulgaris. *Medicina (B Aires)* 2005; 65(4): 307-10.
- 241) Bernard P, Reguiat Z, Tancrede-Bohin E, Cordel N, Plantin P, Pauwels C, et al. Risk factors for relapse in patients with bullous pemphigoid in clinical remission: a multicenter, prospective, cohort study. *Arch Dermatol* 2009; 145(5): 537-42.
- 242) Rzany B, Partscht K, Jung M, Kippes W, Mecking D, Baima B, et al. Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Arch Dermatol* 2002; 138(7): 903-8.
- 243) Claudepierre T, Manglapus MK, Marengi N, Radner S, Champliand MF, Tasanen K, et al. Collagen XVII and BPAG1 expression in the retina: evidence for an anchoring complex in the central nervous system. *J Comp Neurol* 2005; 487(2): 190-203.
- 244) Seppänen A, Miettinen R, Alafuzoff I. Neuronal collagen XVII is localized to lipofuscin granules. *Neuroreport* 2010; 21(17): 1090-4.