

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dubravka P. Živanović

POLIMORFIZAM HLA-DR I HLA-DQ
ALELA KOD PACIJENATA SA
PEMFIGUS VULGARISOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL SCHOOL**

Dubravka P. Zivanovic

**POLYMORPHISM OF HLA-DR AND
HLA-DQ ALLELES IN PATIENTS WITH
PEMPHIGUS VULGARIS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Ljiljana Medenica, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Komentor doktorske disertacije

Prof. dr Dušan Popadić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

1. Doc. dr Snežana Minić, docent Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Miloš Marković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

3. Prof. dr Dragan Jovanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Nišu

Datum odbrane:

Prvenstveno izražavam zahvalnost mentoru, prof. dr Ljiljani Medenici, na izuzetnoj saradnji, istrajnosti i upornosti, kreativnosti i volji, što mi je omogućila da ovaj rad dovedem do kraja.

Najveću zahvalnost dugujem komentoru, prof. dr Dušanu Popadiću, za značajan uticaj na postavku i izradu ovog rada, ogromnoj energiji, posvećenosti i trudu koji je uložio, neizmernom znanju i želji da ga prenese, svesrdnoj pomoći i podršci, bez koje ova disertacija ne bi postojala.

Ogromnu zahvalnost dugujem kumi Bojani, na strpljenju, razumevanju, energiji da nastavim i podršci da u ovome istrajem do kraja.

Zahvaljujem se dr Zorani Andrić na stručnoj pomoći i konkretnim savetima, dr Svetlani Bojić i dr Ivanu Soldatoviću na velikoj pomoći prilikom obrade statističkih podataka.

Prof. dr Milošu Markoviću, kao i Aqualab plus laboratoriji zahvaljujem se na pomoći prilikom realizacije eksperimentalnog dela istraživanja.

Zahvaljujem se prijateljima, saradnicima i kolegama sa Klinike za dermatovenerologiju na strpljenju i razumevanju.

Na kraju, zahvaljujem se svojoj porodici, posebno sestri Jeleni, na ljubavi i bezuslovnoj podršci, razumevanju i energiji da istrajem, i tetkinjoj ljubavi, Dragošu, koji mi je dao razlog da nastavim dalje u ovom poduhvatu.

Rad posvećujem roditeljima.

U Beogradu, 30.05.2016. godine

Dr Dubravka Živanović

POLIMORFIZAM HLA-DR I HLA-DQ ALELA KOD PACIJENATA SA PEMFIGUS VULGARISOM

Sažetak

Uvod: Pemphigus vulgaris (PV) pripada grupi organ specifičnih autoimunskih oboljenja, kod koga se stvaraju autoantitela usmerena na specifične proteine (antigene) kože i sluzokoža. Autoantitela kod pemfigusa su usmerena prema komponentama međucelijskih spojeva (dezmozomima). To su dezmozoglein 3 (Dsg 3), u manjoj meri dezmozoglein 1 (Dsg 1) i drugi proteini. Kao posledica vezivanja cirkulišućih antitela za proteine dezmozoma dolazi do cepanja međucelijskih spojeva (akantolize) i pojave plikova (bula) na koži i sluzokožama.

Autoimunski pemfigus, kao i druge autoimunske bolesti, predstavlja multifaktorsko oboljenje, rizik od nastanka bolesti zavisi od složenih interakcija gena i faktora spoljašnje sredine. U okviru naslednih faktora u etiopatogenezi pemfigusa najviše je ispitivan kompleks gena tkivne podudarnosti koji kodira sistem humanih leukocitnih antigena (HLA). HLA je najpolimorfiji deo humanog genoma. Složenost polimorfizma HLA je posledica postojanja više genskih lokusa, velikog broja alela za većinu gena i kombinacija produkata ovih alela. HLA molekuli II klase su posebno značajni jer prikazuju peptide CD4⁺ T-limfocitima pod čijom kontrolom je sekrecija anti Dsg 3 i anti Dsg 1 antitela od strane B-limfocita. Do sada je dokazana udruženost pojedinih HLA alela sa većim brojem autoimunskih oboljenja uključujući i pemfigus.

Ciljevi istraživanja: Ciljevi ovog istraživanja su bili da se ustanovi učestalost alela i haplotipova u HLA-DR i DQ lokusima kod pacijenata sa PV u Srbiji, da se ustanovi stepen genetske sličnosti sa obolelima od PV u drugim populacijama, kao i da se ispita korelacija između genotipova, težine bolesti i koncentracije Dsg1 i Dsg3 antitela.

Ispitanici i metode: Ispitivanje je izvršeno kod 72 pacijenta sa dokazanim PV. Kod ispitanika je određena alelska učestalost u HLA-DR i DQ lokusima (DRB1*, DQB1* i DQA1*).

Izolacija DNK je rađena upotrebom QIAamp DNA Blood Mini Kit-a (QIAGEN, Germany).

Određivanje grupa alela ispitivanih lokusa je rađeno testovima niske/srednje rezolucije, a potom su testovima visoke rezolucije određivani aleli upotrebom prajmera specifičnih za alelsku sekvencu PCR-SSP (*engl.* Polymerase chain reaction with sequence-specific primers) prema preporukama proizvođača testova (BAG lich Germany i Invitrogen).

Kontrolnu grupu u ovom istraživanju činili su dobrovoljni davaoci kostne srži prijavljeni u Registar dobrovoljnih davalaca kostne srži Srbije. Podaci za distribuciju HLA alela kod pacijenata sa pemfigusom u drugim zemljama prikupljeni su pretragom literature na PubMed pretraživaču.

Za dobijanje učestalosti alela i haplotipova, kao i za testiranje održivosti pretpostavke o Hardy–Weinbergovoj ravnoteži lokusa HLA korišćen je program ARLEQUIN, verzija 3. 11.

Rezultati: Pokazana je statistički značajna razlika učestalosti DRB1*04 (31,9%, $p_{adj}=4,45 \times 10^{-13}$) i DRB1*14 (30,6%, $p_{adj}=4,06 \times 10^{-19}$) alelskih grupa između obolelih od PV i kontrolne grupe, kao i DRB1*11 alelske grupe, koja je bila značajno manje zastupljena kod pacijenata (6,9%, $p_{adj}=0,0067$) ukazujući na eventualnu protektivnu ulogu. Nije pokazana statistički značajna razlika učestalosti DQB1* alelskih grupa između pacijenata sa PV i kontrolne grupe. U odnosu na učestalost alela kod zdrave populacije, najznačajnija razlika postojala je za DRB1*04:02 (29,9%, $p_{adj}=1,63 \times 10^{-12}$, odnos šansi- OŠ 15,469) i DRB1*14:04 alel (13,2%, $p_{adj}=5,20 \times 10^{-7}$, OŠ je bio nedeterminisan zbog odsustva datog alela u zdravoj populaciji Srbije), odnosno za DQB1*03:02 (31,9%, $p_{adj}=1,28 \times 10^{-6}$, OŠ 4,310) i DQB1*05:03 (26,4%, $p_{adj}=4,44 \times 10^{-5}$, OŠ 3,868) alele. Statistički značajno viša učestalost haplotipova kod pacijenata i visok rizik razvoja oboljenja zabeležena je za DRB1*04-DQB1*03 (OŠ 4,409) i DRB1*14-DQB1*05 (OŠ 6,135) haplotipove odnosno testovima visoke rezolucije za DRB1*04:02-DQB1*03:02 (29,9%, OŠ 15,047) i DRB1*14:04-DQB1*05:03 (11,1%, OŠ nedeterminisan zbog odsustva navedenog haplotipa u kontrolnoj grupi). Testovima niske rezolucije, pokazano je da su DRB1*11-DQB1*03, DRB1*01-DQB1*05 i DRB1*03-DQB1*02 haplotipovi bili značajno niže učestalosti kod pacijenata ($p_{adj}<0,05$ i OŠ $<0,4$ za sva tri haplotipa), ukazujući na eventualne protektivne haplotipove. Testovima visoke rezolucije nisu zabeleženi haplotipovi sa značajno nižom učestalošću kod pacijenata.

Zabeležene su značajne razlike distribucije alela među različitim etničkim grupama u ovom istraživanju. Poređenjem učestalosti alela između pacijenata romske i drugih etničkih pripadnosti, statistička značajnost postojala je u odnosu na distribuciju DRB1*04:02 ($p=0,013$), DRB1*14:04 i DRB1*14:54 ($p<0,01$), DQB1*03:02 ($p=0,05$) i DQB1*05:03 ($p=0,01$) alela. Pokazana je značajna korelacija ukupnog stepena aktivnosti bolesti sa koncentracijom očekivanih antiDsg antitela. Nije pokazana korelacija genotipova i stepena aktivnosti bolesti.

Zaključak: Rezultati ovog rada predstavljaju prvi put prikazane učestalosti alela i učestalosti očekivanih haplotipova za lokuse HLA-DRB1* i HLA-DQB1* kod pacijenata sa pemfigusom na teritoriji Srbije. Prikazane su učestalosti alela ispitivanih polimorfizama za HLA-DRB1* i DQB1* lokuse kod pacijenata sa PV u Srbiji i kod obolelih od PV na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla. Ovako dobijeni podaci upotpunjuju dosadašnja saznanja o značaju polimorfizma ispitivanih gena za nastanak pemfigusa.

Ključne reči: HLA, polimorfizam, pemfigus

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Dermatovenerologija

POLYMORPHISM OF HLA-DR AND HLA-DQ ALLELES IN PATIENTS WITH PEMPHIGUS VULGARIS

Abstract

Introduction: Pemphigus vulgaris (PV) belongs to the group of organ specific autoimmune disorders, characterized by the production of pathogenic autoantibodies against keratinocyte adhesion molecules- desmogleins, mostly Desmoglein 3 (Dsg3) and 1 (Dsg1), or other proteins. As a result of bounding autoantibodies to desmosomal proteins, separation of keratinocytes occur with clinical manifestation of blisters on the skin and mucosal membranes.

PV, as other autoimmunes diseases belongs to the family of polygenic disorders, the risk of developing the disease depends on interactions of endogenous genetic factors and environmental factors. Inheritance of certain human leukocyte antigen (HLA) alleles has been suggested to be the most probable predisposing factor. HLA is the most polymorphous part of the human genome. The complexity of HLA polymorphism is due to the existence of a big number of genetic loci, alleles for most of the genes and combination of these alleles. HLA II class genes are particularly important due to peptide presentation to CD4⁺ T-cells and consequent secretion by B- cells of anti-Dsg3 and anti-Dsg1 antibodies. So far, associations of some HLA alleles with a great number of autoimmune diseases have been shown, including pemphigus.

Aims of the investigation: Aims of this study were to determine HLA-DR and HLA-DQ allelic and haplotypic frequencies in patients with pemphigus vulgaris in Serbia; to establish similarities with other PV patients in different populations; to establish correlation between genotypes, disease activity and anti-Dsg3 and anti-Dsg1 antibodies.

Individuals and methods: Investigation of allelic frequency of HLA-DR and HLA-DQ was conducted on 72 patients with diagnosed PV.

DNA was extracted from blood samples using the Qiagen QIAamp DNAMini Kit (Qiagen, Germany). Allele groups were determined with low/intermediary resolution tests. High resolution was performed using polymerase chain reaction sequence-specific primers (PCR-SSP) according to the manufacturer's instructions (BAG lich Germany and Invitrogen). ARLEQUIN software package, version 3.11 was applied for estimated allele and haplotype frequencies, as well as for testing Hardy–Weinberg equilibrium.

Phenotypic and allelic frequencies were compared with healthy volunteers donors registered in the national registry of bone marrow donors of Serbia. Comparison of allelic frequencies among different ethnic populations was recorded through searching results on PubMed.

Results: The DRB1*04 and DRB1*14 allelic groups were significantly increased in patients (31.9%, $p_{\text{adj}}=4.45 \times 10^{-13}$ and 30.6%, $p_{\text{adj}}=4.06 \times 10^{-19}$, respectively) compared to healthy donors, while HLA-DRB1*11 was underrepresented and negatively associated with PV (6.9%, $p_{\text{adj}}=0.0067$) suggesting its protective role. No DQ* allele groups were found to be associated with PV. Compared to healthy population, frequencies of DRB1*04:02 (29.9%, $p_{\text{adj}}=1.63 \times 10^{-12}$, odd ratio- OR 15.469) and DRB1*14:04 (13.2%, $p_{\text{adj}}=5.20 \times 10^{-7}$, due to the absence of the allele in healthy population, OR was undetermined) alleles were the most significant. Statistical significance was recorded for the DQB1*03:02 (31.9%, $p_{\text{adj}}=1.28 \times 10^{-6}$, OR 4.310) and DQB1*05:03 (26.4%, $p_{\text{adj}}=4.44 \times 10^{-5}$, OR 3.68) alleles. At low-resolution level, significantly increased haplotypes in patients compared to controls, with a higher risk of developing PV were DRB1*04-DQB1*03 (OR 4.409) and DRB*14-DQB1*05 (OR 6.135). At high-resolution level, statistical significance was recorded for the most frequent haplotypes in patients- DRB1*04:02-DQB1*03:02 (29.9%, OR 15.047) and DRB1*14:04-DQB1*05:03 (11.1%, OR undetermined due to the absence of this haplotype in healthy population). At low-resolution level, DRB1*11-DQB1*03, DRB1*01-DQB1*05 and DRB1*03-DQB1*02 haplotypes were significantly underrepresented in patients ($p_{\text{adj}} < 0.05$), with OR < 0.4 for all three haplotypes, suggesting eventually protective haplotypes. At high-resolution level, no haplotypes were significantly underrepresented in patients.

Significant differences were recorded among allelic distribution between patients of different ethnic origin in this study. Comparing allelic distribution between Roma patients and patients of other ethnic origin, differences were shown for DRB1*04:02 ($p=0.013$), DRB1*14:04 and DRB1*14:54 ($p < 0.01$) alleles, as well as for DQB1*03:02 ($p=0.05$) and DQB1*05:03 ($p=0.01$) alleles. We have shown significant correlation between severity index of PV and antiDsgs antibodies. No significant correlation between haplotypes and severity index was shown.

Conclusions: This study results are the first shown allelic and haplotype frequencies of HLA-DR and HLA-DQ loci among patients with PV in Serbia. Comparisons of the obtained HLA-DRB1* and DQB1* polymorphism, in Serbia and other different ethnic populations were shown. These results supplement current knowledge of significance of investigated gene polymorphism in the development of pemphigus.

Key words: HLA, polymorphism, pemphigus

Scientific field: Medicine

Specialised scientific field: Dermatology

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	DEFINICIJA PEMFIGUSA I EPIDEMIOLOŠKE ODLIKE	2
1.2.	ETIOPATOGENEZA AUTOIMUNSKOG PEMFIGUSA	3
1.2.1.	NASLEĐE	3
1.2.2.	MHC LOKUS	4
1.2.2.1.	Građa, funkcija i distribucija HLA molekula	6
1.2.2.2.	Nasleđivanje HLA gena	8
1.2.2.3.	HLA tipizacija	8
1.2.2.4.	Udruženost HLA alela sa bolestima	9
1.2.3.	DRUGI LOKUSI KOJI SU POVEZANI SA PEMFIGUSOM	11
1.2.4.	MEHANIZMI OŠTEĆENJA TKIVA U PEMFIGUSU	12
1.2.4.1.	Građa dezmozoma	12
1.2.4.2.	Značaj T ćelija u nastanku anti Dsg antitela	14
1.2.4.3.	Uloga antitela protiv dezmozogleina u oštećenju epitela	14
1.2.4.4.	Antitela protiv drugih proteina i ostali mehanizmi koji izazivaju akantolizu	15
1.2.4.5.	Predloženi modeli oštećenja	16
1.2.5.	FAKTORI SPOLJAŠNJE SREDINE	19
1.3.	KLASIFIKACIJA PEMFIGUSA	22
1.4.	KLINIČKA PREZENTACIJA	23
1.4.1.	PEMPHIGUS VULGARIS (PV)	23
1.4.2.	PEMPHIGUS VEGETANS (P VEG)	24
1.4.3.	PEMPHIGUS FOLIACEUS (PF)	24
1.4.4.	PEMPHIGUS ERYTHEMATOSUS (PE)	25
1.4.5.	PEMPHIGUS HERPETIFORMIS (PH)	25
1.4.6.	IGA PEMPHIGUS	25
1.4.7.	PEMPHIGUS PARANEOPLASTICUS (PNP)	26
1.5.	DIJAGNOZA	27
1.5.1.	HISTOPATOLOŠKE PROMENE	27
1.5.2.	DIREKTNIMUNOFLUORESCENTNI TEST (DIF)	28
1.5.3.	INDIREKTNIMUNOFLUORESCENTNI TEST (IIF)	28
1.5.4.	TZANCKOV TEST	29
1.5.5.	ELISA (ENG. ENZYME - LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	29
1.5.6.	OSTALA IMUNOLOŠKA ISPITIVANJA	30
1.6.	STEPEN AKTIVNOSTI BOLESTI	31
1.7.	UDRUŽENOST PEMFIGUSA I DRUGIH OBOLJENJA	32
1.8.	TERAPIJA PEMFIGUSA	33
2.	CILJEVI RADA	38
3.	MATERIJAL I METODE	40
3.1.	SELEKCIJA ISPITANIKA	41
3.1.1.	KRITERIJUMI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE I PODELA NA PODTIPOVE PEMFIGUSA	41
3.1.2.	PROCENA AKTIVNOSTI BOLESTI KOD PACIJENATA SA PEMPHIGUS VULGARISOM	41
3.1.3.	ZDRAVE KONTROLE	41
3.2.	UZIMANJE UZORAKA KRVI OD ISPITANIKA	42
3.2.1.	IZOLACIJA DNK	42
3.2.2.	HLA TIPIZACIJA	43
3.2.3.	ODREĐIVANJE ALELSKE GRUPE - NISKA REZOLUCIJA	43
3.2.4.	HLA VISOKA REZOLUCIJA	44
3.3.	ELISA	45
3.4.	DIJAGNOSTIČKE PROCEDURE	46
3.4.1.	DIREKTNIMUNOFLUORESCENTNI TEST	46
3.4.2.	HISTOPATOLOŠKI NALAZ	46
3.4.3.	INDIREKTNIMUNOFLUORESCENTNI TEST	47

3.5.	OBRADA PODATAKA	47
3.5.1.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	47
3.5.2.	TESTIRANJE HARDY-WEINBERG RAVNOTEŽE	47
3.5.3.	OSTALE STATISTIČKE METODE	48
4.	REZULTATI	49
4.1.	EPIDEMIOLOŠKI PODACI	50
4.2.	KLINIČKE KARAKTERISTIKE PACIJENATA	51
4.2.1.	ZAHVAĆENOST SLUZOKOŽA	51
4.2.2.	STADIJUM BOLESTI	51
4.2.3.	STEPEN AKTIVNOSTI BOLESTI	52
4.2.4.	KOMORBIDITET I FAMILIJARNI PEMFIGUS	54
4.2.5.	TERAPIJSKI PRISTUP	54
4.2.6.	KOMPLIKACIJE	56
4.3.	POLIMORFIZAM HLA LOKUSA	56
4.3.1.	ALELSKA GRUPA- NISKA REZOLUCIJA	56
4.3.2.	ALELI- VISOKA REZOLUCIJA	59
4.3.3.	DVOALELSKI HAPLOTIPOVI	61
4.3.4.	POLIMORFIZAM DQA1* LOKUSA I UČESTALOST TROALELSKIH HAPLOTIPOVA	63
4.3.5.	UDRUŽENOST DRB1* I DQB1* ALELA SA PEMFIGUSOM KOD DRUGIH ETNIČKIH PRIPADNOSTI NA RAZLIČITIM GEOGRAFSKIM PODRUČJIMA	64
4.3.6.	PROTEKTIVNI ALELI KOD PACIJENATA SA PV U SRBIJI I KOD RAZLIČITIH ETNIČKIH PRIPADNOSTI NA DRUGIM GEOGRAFSKIM PODRUČJIMA	67
4.3.7.	ALELI I HAPLOTIPOVI KOD PACIJENATA PACIJENATA RAZLIČITE ETNIČKE PRIPADNOSTI U SRBIJI	69
4.4.	IMUNOLOŠKA ISPITIVANJA	70
4.4.1.	ANTIGENSKI PROFIL	70
4.4.1.1.	Titar antiDsg1 i antiDsg3	72
4.4.1.2.	AntiDsg1 i 3 u odnosu na podtip pemfigusa i stepen aktivnosti bolesti	73
4.4.2.	IIF TEST	75
4.5.	KORELACIJA IZMEĐU GENOTIPOVA, KLINIČKOG TOKA BOLESTI I TITROVA ANTI DSG3 I DSG1 ANTITELA	78
4.5.1.	ALELI HLA-DRB1 I DQB1 LOKUSA - KORELACIJA SA KLINIČKIM FENOTIPOM, NIVOOM AUTOANTITELA I TEŽINOM KLINIČKE SLIKE I UČESTALOST MEĐU POLOVIMA	78
4.5.1.1.	Korelacija sa kliničkim fenotipom	78
4.5.1.2.	Učestalost DRB1 i DQB1 alela među polovima	78
4.5.1.3.	Uzrast oboljevanja kod nosioca različitih alela i haplotipova	78
4.5.1.4.	Korelacija sa nivoom antiDsg3 i antiDsg1 i stepenom aktivnosti bolesti	79
5.	DISKUSIJA	81
6.	ZAKLJUČCI	102
7.	LITERATURA	105

1. UVOD

1.1. Definicija pemfigusa i epidemiološke odlike

Pemfigus pripada grupi organ specifičnih autoimunskih oboljenja kod koga se stvaraju autoantitela prema adhezivnim molekulima pločasto slojevitog epitela naročito dezmogleinima (Dsg) [1, 2]. Autoimunska pemfigus je retko ali jedno od najtežih dermatoloških oboljenja koje se javlja u svim geografskim područjima, kod svih rasa i etničkih grupa [3]. Dugo se verovalo da je oblik pemfigusa koji se javlja endemski, karakterističan za Brazil i još neke zemlje latinske amerike, tzv. *Fogo selvagem*. U pojedinim ruralnim područjima na ovim teritorijama prevalencija iznosi oko 3-4% [4-6]. Međutim, nedavno je dokazana veća učestalost pemfigusa i u pojedinim zemljama Magreba za koji je takođe pokazano da ima određene endemske karakteristike [7].

Incidencija i prevalencija u velikoj meri zavise od ispitivane populacije budući da postoji dominacija za određena etnička područja. Incidencija svih oblika neendemskog pemfigusa je veća kod Jevreja [3]. Rizik razvoja autoimunskog pemfigusa je visok i kod populacija nastanjenih na Balkanskom poluostrvu i okolnim zemljama [8]. U susednoj Makedoniji incidencija je 4,4/1000 000 [4], u severnom delu Grčke 8/1000 000 [9]. Slična incidencija je i u Bugarskoj- 4,7/1000 000 [8] i severozapadnom delu Rumunije- 4/1000 000 [10]. U mediteranskom delu Turske incidencija iznosi 2,4/1000 000 [11]. U zemljama srednje, zapadne i severne Evrope incidencija niža i kreće se od 0,076/1000 000 u Finskoj preko 0,6/1000 000 u Švajcarskoj [12], 0,98/1000 000 u Nemačkoj [13] do 1,17/1000 000 u Francuskoj [12]. Izuzetak je Velika Britanija sa incidencijom od 7/1000 000 [14]. Pemfigus je najčešće autoimuno bulozno oboljenje u zemljama Azije [15, 16]. U Iranu (Teheran) incidencija je čak 16/1000 000 [6]. Visoka incidencija zabeležena je i u zemljama severne Afrike, kao što je Tunis [17]. Shodno utvrđenom riziku oboljevanja od pemfigusa kod Jevreja, incidencija u Jerusalimu iznosi 16/1000 000 [18].

Za Srbiju još uvek nema tačnih podataka o incidenciji. Na osnovu studije Golušina i saradnika, incidencija autoimunskog pemfigusa u Vojvodini je slična kao u zemljama regiona i iznosi 6,6/1000 000 [19].

Odnos dve najčešće forme pemfigusa (*pemphigus vulgaris* i *pemphigus foliaceus*) zavisi od ispitivane populacije. Najčešća forma pemfigusa u većini opisanih studija je *pemphigus vulgaris*, i na ovu bolest se odnosi od 67,6- 94,7% svih slučajeva pemfigusa [4, 6, 8, 11, 15, 16, 20-26]. Među pripadnicima pojedinih populacija crnaca južne Afrike, kao i kod mlađe

populacije u Tunisu i Maroku češće su zabeležene superficijelne forme pemfigusa (*pemphigus foliaceus*) [17, 27, 28].

Zastupljenost oboljenja iz grupe pemfigusa prema polovima takođe se razlikuje u odnosu na ispitivanu populaciju. Uglavnom je zabeležena predominacija ženskog pola [4, 8, 10-13, 17, 23, 27, 29-31]. U zemljama Magreba, učestalost kod ženskog pola je visoka, 4.1 žena: 1 muškarac; u ostalim studijama taj odnos je od 1.2:1 do 2.2: 1 [4, 6, 9-12, 17, 29].

Od pemfigusa najčešće obolevaju osobe srednjih i starijih godina. U Evropi, prosečna starost obolelih iznosi 50 - 60 godina, dok je u mediteranskim zemljama niža i iznosi 36,7 (Tunis) odnosno 43 godine (mediteranski deo Turske) [11]; u Aziji (Saudijska Arabija, Iran, Mali, Bangladeš) prosečna starost obolelih je između 36,5- 46,7 godina [6, 15, 25, 31]. U Srbiji, na teritoriji Vojvodine prosečna starost oboljevanja iznosi 55,6 godina [19].

Oboljenje može da se javi u svim uzrasnim grupama, uključujući i decu [32]. Pojava juvenilnog pemfigusa (između 12. i 18. godine) odnosno pemfigusa u dečjem uzrastu (ispod 12. godine) je takođe izuzetno retka, a tok i prognoza oboljenja su isti kao i kod odraslih [32, 33]. Juvenilni pemfigus i pemfigus u dečjem dobu su nešto učestaliji u populaciji sa većim rizikom oboljevanja od pemfigusa [29].

Najstariji pacijenti oboleli od pemfigusa u vreme nastanka bolesti su imali 92 [18], 93 [28] i 95 [23] godina, dok je najmladji pacijent imao 1,5 godinu [34].

Neonatalni pemfigus se viđa u oko 10% neonatusa majki obolelih od *pemphigus vulgaris* kao i kod dece majki obolelih od *pemphigus foliaceus* [32, 35]. Neonatalni pemfigus se po toku i prognozi izdvaja od klasične kliničke forme pemfigusa [32]. Mukoze su ređe zahvaćene, kutane lezije regresiraju za 3-6 nedelja i dolazi do iščezavanja autoantitela kod odojčeta u roku od 5 dana do 8 nedelja [32, 35].

1.2. Etiopatogeneza autoimunskog pemfigusa

1.2.1. Nasleđe

U većini slučajeva pemfigus je jedno od najjasnije definisanih autoimunskih bolesti posredovane antitelima i služi kao pogodan model za izučavanje i upoznavanje kompleksnih mehanizama koji dovode do gubitka tolerancije na sopstveno. Kod određenog broja

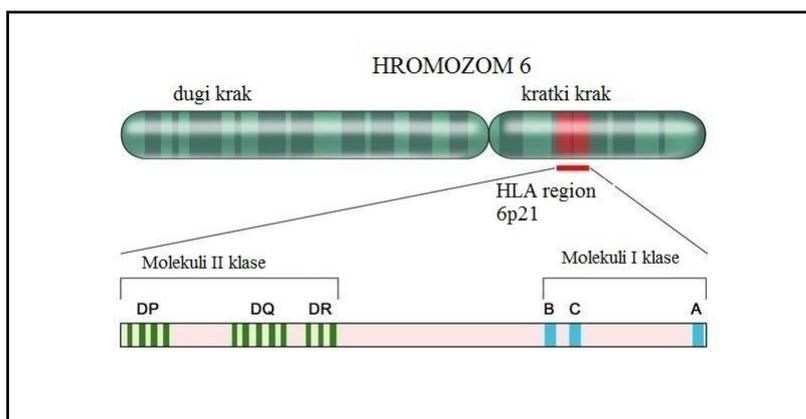
pacijenata, imunofluorescentni testovi mogu biti negativni, najčešće kada je oboljenje pokrenuto lekom (biohemijska akantoliza) [36].

Dosadašnja istraživanja ukazuju da autoimunski pemfigus, kao i druge autoimunske bolesti, predstavlja multifaktorsko oboljenje kod koga rizik od nastanka bolesti zavisi od složenih interakcija gena i faktora spoljašnje sredine [2, 37, 38]. Budući da je nastanak pemfigusa rezultat gubitka imunske tolerancije na antigene u koži, brojni geni koji su uključeni u prezentaciju antigena limfocitima, kao i efektorske ili regulatorne mehanizme imunskog sistema mogli bi imati značajnu patogenetsku ulogu. Populacione studije omogućuju ispitivanje udruženosti između faktora rizika i oboljenja na osnovu poređenja kod obolelih i zdravih kontrolnih individua [37]. Za sada su ispitivanja mogućih gena odgovornih za rizik razvoja pemfigusa bazirana na studijama preseka kojim se ispituju određeni geni (lokusi) za koje se pretpostavlja da imaju moguću ulogu u nastanku oboljenja. Ovakva ispitivanja su do sada više puta pokazala i potvrdila ulogu kompleksa gena tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC) [37].

1.2.2. MHC lokus

MHC lokus je najviše ispitivan genski lokus. Prvi put je identifikovan 1948. godine od strane Snella kod miševa i ukazano je na njegovu ulogu u tkivnoj podudarnosti; ubrzo nakon toga, Dausset je dokazao postojanje analognih molekula kod ljudi, koji su nazvani humani leukocitni antigeni (HLA) jer ih je autor u svom radu dokazao na površini leukocita [39]. Benacerraf i saradnici 1970. godine ukazuju na važnost HLA antigena u imunskom odgovoru [39].

MHC region koji kodira HLA molekule obuhvata oko 3,6 Mb (*engl.* megabase pairs) na segmentu kratkog kraka hromozoma 6p21 [40] (slika 1). Na segmentu DNK od oko 3,6 Mb, što čini 0,13% humanog genoma, nalazi se preko 250 gena čiji su produkti većinom uključeni u procese imunskog i inflamatornog odgovora [40]. Unutar kompleksa gena MHC nalaze se odvojeni regioni koji kodiraju molekule HLA klase I i klase II. Geni regiona klase I HLA se nalaze na telomernom kraju MHC-a i obuhvataju oko 1800 kilobaza (kb), dok se geni regiona klase II HLA nalaze na centromernom kraju MHC-a i obuhvataju oko 800 kb.



Slika 1. Genska organizacija regiona MHC
(preuzeto iz <http://www.slideshare.net>)

Region klase I HLA i region klase II HLA su razdvojeni segmentom DNK koji se naziva III klasa od oko 1100 kb gde su smešteni geni koji ne kodiraju HLA molekule (non-HLA geni) [40]. Produkti gena MHC su molekuli uključeni u prezentaciju antigena, inflamaciju i interakciju sa NK ćelijama (*eng.* natural killer) [40]. HLA molekuli klase I i klase II i razlikuju se po strukturi, distribuciji na ćelijama (ekspresiji) i poreklu peptida koje prikazuju T limfocitima [41].

Visoko polimorfni geni regiona klase I nalaze se u okviru tri genska lokusa: HLA-A, HLA-B i HLA-C, a njihovi produkti zajedno sa pojedinim produktima II klase predstavljaju glavne antigene tkivne podudarnosti. Region klase II zauzima oko 0.7Mb DNK i sadrži klasične alfa i beta lance tri subregiona: HLA-DR, HLA-DP i HLA-DQ; identifikovano je 27 lokusa u regionu klase II, od HLA-DRA do HLA-DPA3 [40]. Svaki subregion ima više genskih lokusa sa različitim brojem alela koji kodiraju alfa i beta lanac antigena DR, DQ i DP.

Geni sistema HLA po pravilu se nasleđuju kao vezani geni odnosno haplotip (set gena na jednom hromozomu). Svaka osoba ima dva haplotipa HLA (koji čine HLA fenotip), jedan nasleđen od oca i drugi od majke. S obzirom da su geni HLA autozomni, a ekspresija alela kodominantna, fenotip jedne osobe predstavlja kombinaciju ekspimiranih antigena sa oba haplotipa [41]. Rekombinacije između lokusa HLA-B i HLA-C, kao i između HLA-DQ i HLA-DR su veoma retke, što je posledica male udaljenosti između ovih lokusa, dok su rekombinacije između lokusa HLA-DQ i HLA-DP češće [42].

Za sistem HLA karakterističan je veoma visok stepen polimorfizma koji je uslovljen velikim brojem genskih lokusa, velikim brojem alela za većinu gena i kombinacijama produkata ovih gena. Visok stepen polimorfizma HLA omogućava imunskom sistemu odbranu od različitih

patogena, a sa druge strane upravo zbog visokog stepena polimorfizma kao i zbog mutacija u HLA lokusima povećan je rizik razvoja autoimunskih i genetičkih oboljenja [40]. Polimorfizam je naročito izražen u β lancu- na egzonu 2 ($\alpha 1$ domen) dok je DRA ($DR\alpha$) gen nepolimorfan a DQA1 i DPA1 lokusi su značajno manje polimorfni [41]. Najpolimorfiji genski lokus u humanom genomu je lokus klase II - HLA-DRB1 (za β lanac antigena HLA-DR) [39]. HLA-DRB1 u kombinaciji sa HLA-DRA (za α lanac antigena HLA-DR) kodira serološki definisane specifičnosti HLA-DR1 do HLA-DR18. Geni HLA regiona mogu biti u interakciji sa drugim genima u okviru i izvan MHC regiona i interakcije između različitih alela mogu doprinosti razvoju bolesti [40].

U subregionu HLA-DQ nalaze se polimorfni geni HLA-DQA1 i HLA-DQB1 koji kodiraju α i β lanac antigena HLA-DQ1 do HLA-DQ9; geni HLA-DPA1 i HLA-DPB1 kodiraju antigene HLA-DP i udaljeni su oko 400 bp od gena za HLA-DQ [40, 41].

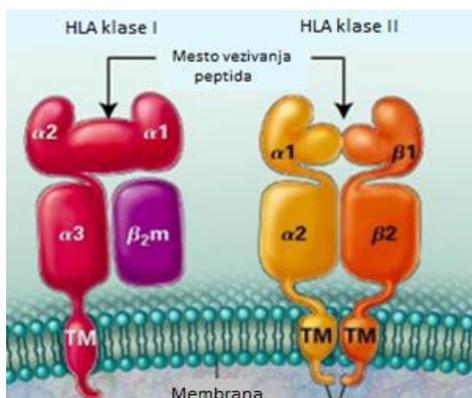
Polimorfizam gena za molekule transportere koje učestvuju u obradi antigena (*engl.* transporters associated with antigen processing molecules, TAP) koji se nalaze u okviru HLA I lokusa su takodje analizirani [43]. TAP geni kodiraju subjedinice kompleksa koji se umeće u membranu endoplazmatskog retikuluma omogućujući premeštanje antigenih peptida iz citosola u lumen endoplazmatskog retikuluma i prezentaciju u okviru HLA molekula I klase [43, 44]. TAP1 i TAP2 geni takodje su polimorfni. Funkcionalne posledice u alelskim razlikama TAP proteina mogu da utiču na ekspresiju antigenih peptida.

1.2.2.1. Građa, funkcija i distribucija HLA molekula

HLA molekuli vezuju fragmente sopstvenih ili stranih proteina (peptide) i prikazuju ih $CD4^+$ ili $CD8^+$ T-limfocitima. HLA molekuli I klase se nalaze na površini svih ćelija sa jedrom. Antigeni klase II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) su, za razliku od klase I, prisutni na ograničenom broju tipova ćelija, pre svega antigen prezentujućim ćelijama (APC) imunskog sistema u perifernim tkivima (dendritske ćelije, monociti i makrofagi, B limfociti i endotelu), koje mogu da iskazuju i kostimulatorne molekule i da indukuju specifičan T ćelijski odgovor. Konstitutivna ekspresija molekula II klase na epitelnim ćelijama timusa je važna u stvaranju T ćelijskog repertoara kroz pozitivnu i negativnu selekciju limfocita T u timusu.

HLA molekuli I i II klase su glikoproteini membrane [40]. HLA molekuli I klase (A, B, C) se sastoje od α lanca (45 kDa) nekovalentno udruženog sa $\beta 2$ mikroglobulinom (12 kDa); α lanac je polimorfni glikoprotein kodiran genima A, B i C lokusa u okviru HLA regiona,

sastoji se od ekstracelularnog domena ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$), transmembranskog dela i citoplazmatskog repa (slika 2). $\beta 2$ mikroglobulin je nepolimorfni glikoprotein kodiran genom izvan HLA regiona [41]. Varijabilni domeni $\alpha 1$ i $\alpha 2$ formiraju žljeb za vezivanje antigenskog peptida (veličine 8-11 aminokiselina) a konstantni $\alpha 3$ domen se vezuje za CD8 molekul na T limfocitima.



Slika 2: Struktura molekula HLA klase I i klase II
(Andric Z, 2014)

HLA molekuli II klase (DR, DQ i DP) su heterodimeri, sastoje se iz dva nekovalentno vezana polipeptidna lanca, α (33 kDa) i β (28 kDa) kodirana genima u okviru D regiona HLA kompleksa, transmembranskog dela (25 aminokiselina) i citoplazmatskog repa (varijabilne dužine) [41]. Ekstracelularni deo HLA molekula II klase (oko 180 aminokiselina) ima četiri domena - $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ i $\beta 2$. N-terminalni krajevi $\alpha 1$ i $\beta 1$ domena su mesta najvećeg polimorfizma i grade mesto vezivanja antigena. Krajevi žljebova su otvoreni, tako da u mesto za vezivanje peptida molekula klase II može da stane peptid i sa više od 30 aminokiselina. $\alpha 2$ i $\beta 2$ domeni su konstantni, tj nepolimorfni, odnosno redosled aminokiselina ovih domena je isti kod svih molekula II klase, i vezuju se za CD4 molekul na T limfocitima [41].

Polimorfizam HLA molekula uključuje aminokiseline koje doprinose izgledu i naelektrisanju žljebova [37]. Žljeb za vezivanje peptida na HLA molekulima II klase sadrži veći broj delova od kojih njih pet (P1, P4, P6, P7 i P9) reaguju sa aminokiselinama bočnih lanaca vezanog peptida [37, 45].

Peptidi koji se prezentuju T limfocitima u sklopu molekula HLA klase II nastaju preradom pretežno ekstracelularnih antigena koji se internalizuju od strane APC, dospevaju u vezikule gde dolazi do enzimske razgradnje (najviše katepsinom) do peptida. Lanac α i lanac β molekula klase II se sintetišu u endoplazmatskom retikulumu, a njihovo međusobno

povezivanje omogućavaju šaperoni. Obradom jednog antigena nastaje veliki broj peptida koji se eksprimiraju na površini ćelijske membrane u sklopu molekula HLA, ali značajni su oni peptidi koji mogu da pokrenu imunski odgovor odnosno aktivaciju T limfocita

1.2.2.2. *Nasleđivanje HLA gena*

Za sistem HLA karakteristična je i neravnoteža udruživanja alela ili gametski disekvilibririjum (*engl.* linkage disequilibrium, LD) - pojava da se određeni aleli susednih lokusa pojavljuju zajedno u haplotipu mnogo češće ili ređe nego što bi se očekivalo s obzirom na učestalost tih pojedinačnih alela u populaciji (zbog činjenice da su geni fizički vrlo blizu jedni drugima pa je verovatnoća da se dogodi rekombinacija tokom mejoze između tih gena minimalna i zato se nasleđuju u bloku odnosno kao vezani geni ili haplotip) [46].

Analize polimorfizma HLA i neravnoteže udruživanja alela, kao i razlike učestalosti alela i haplotipova HLA među populacijama, imaju praktičnu primenu prilikom izbora davaoca za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze i značaj u ispitivanju udruženosti HLA sa etiopatogenezom nekih bolesti. Neravnoteža udruživanja alela se izražava numerički kao vrednost D, koji predstavlja razliku između dobijene i očekivane učestalosti haplotipa, i standardizovana vrednost D' [47]. Broj haplotipova HLA u humanoj populaciji je manji nego što bi se moglo očekivati s obzirom na broj alela i pojavu rekombinacija unutar regiona HLA, a haplotipovi imaju različitu učestalost u različitim etničkim grupama [42].

1.2.2.3. *HLA tipizacija*

Određivanje antigena i alela sistema HLA (HLA tipizacija) radi se serološkim i molekularnim testovima. Serološkim testovima se određuje fenotip, odnosno antigeni na površini ćelija, upotrebom odgovarajućih test seruma. Molekularnim testovima se određuje genotip, odnosno dokazuju aleli HLA. U zavisnosti od raspoloživih tehnika i kliničkih potreba, uobičajeno se prvo određuju antigeni ili grupe alela za svaki lokus, a zatim se definišu pojedinačni aleli [41]. Početkom osamdesetih godina, razvojem molekularnog kloniranja gena I i II klase dolazi do razvijanja tehnika molekularne tipizacije [41]. U radu HLA laboratorija koriste se različite molekularne tehnike tipizacije HLA zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze (*engl.* Polymerase chain reaction, PCR) kao što su hibridizacija umnožene DNK sekvence sa oligonukleotidnim probama (*engl.* Polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide probes, PCR-SSOP) i detekcija razlike u sekvenci na osnovu različite pokretljivosti PCR produkta upotrebom gel elektroforeze, odnosno upotrebom prajmera

specifičnih za alelsku sekvencu (*engl.* Polymerase chain reaction with sequence-specific primers, PCR-SSP) [41, 48].

Rezultat HLA tipizacija može biti niske i visoke rezolucije. Niska rezolucija (*engl.* low resolution) podrazumeva rezultat DNK tipizacije na nivou prve dve cifre nomenklature alela (*engl.* 2-digits) tj. podrazumeva određivanje grupe alela (npr. HLA-DRB1*01). Visoka rezolucija (*engl.* high resolution) tipizacije je određivanje alela koji kodiraju istu proteinsku sekvencu peptid vezujućeg mesta molekula HLA. Peptid vezujuća mesta čine domeni α 1 i β 1 polipeptida klase II, tako da testovi visoke rezolucije moraju da omoguće definisanje egzona 2 za region klase II HLA. Rezultat tipizacije visokom rezolucijom podrazumeva prikazivanje prve dve grupe cifara alela, odnosno ukupno četiri cifre u nomenklaturi alela (*engl.* 4-digits) (npr. HLA-DRB1*04:02).

Razvojem tehnika molekularne tipizacije otkriveno je preko 4600 alela u sistemu HLA. Najpolimorfiji lokus klase I je HLA-B sa 1800 alela, a klase II je HLA-DRB1 sa 809 alela [41].

1.2.2.4. Udruženost HLA alela sa bolestima

Udruženost različitih varijanti ovog genskog lokusa i autoimunskih ili inflamatornih bolesti više puta je potvrđivana [39, 40, 46]. Prvi put je 1967. godine ukazano na učestaliju pojavu HLA- B molekula kod pacijenata sa Hodgkin-ovim limfomom [39].

Zbog velikog polimorfizma HLA i izražene neravnoteže udruživanja vezanih gena u regionu HLA, kao i činjenica da na etiopatogenezu ovih bolesti utiču i druge genetske varijante, nije moguće u potpunosti ustanoviti molekularni mehanizam koji je u osnovi udruženosti bolesti sa sistemom HLA. U osnovi autoimunskih bolesti je aktivacija limfocita T usled prepoznavanja tkivno specifičnih autoantigena prezentovanih u sklopu molekula HLA. Međutim, u većini autoimunskih bolesti nije poznat koji je autoantigen relevantan za pojavu bolesti [39]. Takođe, zbog heterogenosti autoimunskih bolesti, verovatno je da različiti aleli, kao i kombinacije alela različitih lokusa mogu uticati na pojavu određenih formi bolesti. Step en udruženosti bolesti sa HLA se izražava kao relativni rizik (RR) a izračunava se primenom modifikacija formule $a \times d / b \times c$ gde je a broj obolelih osoba koje imaju ispitivani alel, b broj obolelih osoba koje nemaju ispitivani alel, c broj zdravih osoba koje imaju ispitivani alel i d broj zdravih osoba koje nemaju ispitivani alel [42].

Udruženost pojedinih HLA alela II klase i pemfigusa opisana je još 1980 i do sada je više puta potvrđivana i opisivana kod različitih etničkih grupa [37, 45].

Analizom polimorfizma određenih HLA lokusa u dosadašnjim istraživanjima potvrđeno je prisustvo pojedinih alela u različitom procentu u zavisnosti od ispitivane populacije. Udruženost HLA-DR4 i DR14, odnosno HLA-DRB1*14:01 i HLA-DRB1*04:02 alela i autoimunskog pemfigusa se opisuju u većini ispitivanih studija [37, 45, 48-52]. Udruženost HLA-DRB1 lokusa (HLA-DRB1*14:01, 14:02 i 04:02 aleli), HLA-DQA1 lokusa (HLA-DQA1*01:04, 03:01 i 05:05) i HLA-DQB1 lokusa (DQB1*05:03 i 03:02 aleli) je zabeležena u oko 36-60% pacijenata sa pemfigusom koji nisu jevrejske etničke pripadnosti [1, 50, 51, 53-56]. Udruženost HLA-DRB1*04:02 alela opisana je kod 92% Aškenazi Jevreja, 85% Iranaca i 81% žitelja Sardinije dok se prevalencija ovog alela u zdravoj populaciji u opisanim studijama kretala od 2-4% [37, 50, 51]. Kod Japanaca dokazana je udruženost i drugih DR4 alela, kao što su DRB1*04:03, 04:04 and 04:06 [49, 57]. Takođe, u raznim drugim populacijama, pokazana je udruženost DR14 alela kao što su DRB1*14:01 i 14:04, kao i DRB1*14:05 [49, 57]. U pojedinim evropskim populacijama zabeležena je i udruženost pemfigusa sa HLA-DRB1*14:54 alelom [58, 59]. Pojedini aleli se javljaju u značajno manjem procentu u odnosu na ispitivanu zdravu populaciju i smatraju se protektivnim alelima kao npr. DQB1*06:01 DQB1*02, DRB1*03:01, DRB1*07, DQA1*01:03 i DQA1*05:01 [45, 49].

Wucherpfennig i saradnici su prvi ukazali na proliferaciju T ćelija kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom zavisnu od peptida prikazanih molekulom DRB1*04:02 [60] a Lin i saradnici molekulima DRB1*04:02 ili DRB1*14:01 ukazujući na ulogu DR lokusa (gena) u prezentaciji Dsg3 peptida autoreaktivnim T ćelijama [49]. Sa druge strane Hertl i saradnici su pokazali da pored DRB1*04:02 i DQ molekuli (DQB1*03:01) takođe mogu da prikazuju Dsg3, što govori u prilog tome da iako su DR4 i DR14 ključni u restrikciji T- ćelijskog odgovora prema Dsg3 peptidima, uloga DQ alela ne može biti isključena [49, 61, 62]. Ispostavilo se da je negativno naelektrisanje P4 udubljenja DRB1*04:02 (aminokiseline na poziciji DRB70 i DRB71) i DQB1*05:03 (aminokiseline na poziciji DQB57) neophodno za selektivnu prezentaciju antigenih Dsg peptida [49, 61].

HLA-DRB1*04:02 kod pemfigusa se od drugih molekula DR4 podklase razlikuje zbog negativnog naelektrisanja u P4 i stoga bi mogao selektivno da prikazuje Dgs3 peptid [37]. Sa druge strane, HLA-DRB1*04:01 koji je takođe udružen sa pemfigusom ne poseduje iste aminokiseline kao HLA-DRB1*04:02 što govori u prilog da različiti peptidi mogu

učestvovati u inicijaciji autoimunskog odgovora ili pak da drugi delovi HLA-DRB1 lanca doprinose predispoziciji bolesti [37].

S obzirom da postoji jaka neravnoteža udruživanja alela između HLA-DR i HLA-DQ alela, teško je tačno definisati koji aleli doprinose podložnosti bolesti [45]. Imunodominantni epitop mogao bi indukovati T ćelijski odgovor koji će kasnije biti promenjen zbog fenomena širenja epitopa (*engl.* epitope spreading). Udruženost sličnih HLA alela kod pacijenata sa oba podtipa pemfigusa može ukazivati da homologni peptidi Dsg1 i Dsg3 prezentovani T ćelijskim klonovima dovode do njihove aktivacije a kasnije i do indukcije B limfocita da sekretuju antiDsg3 kod nekih pacijenata sa pemfigus foliaceusom odnosno antiDsg1 kod nekih pacijenata sa pemfigus vulgarisom [49]. T-ćelijski klonovi kod pacijenata sa pemfigusom mogu da prepoznaju multiple epitope na celom ekstracelularnom domenu Dsg; i Dsg1 i Dsg3 što bi mogla biti posledica fenomena širenja antigenih epitopa. Wucherpfennig i saradnici su zabeležili dva epitopa na EC2 domenu a Lin i saradnici su pokazali da su T limfociti kod pacijenata sa PV stimulisani brojnim fragmentima Dsg, i to EC1-EC2, EC2-EC3 i EC5 [60]. Autoimunost prema određenim epitopima Dsg 3 može se smatrati normalnim fiziološkim procesom jer je dokazano prisustvo Dsg3 reaktivnih B limfocita i Th1 i Th2 limfocita kod zdravih osoba koji imaju HLA alele karakteristične za pemfigus [62].

1.2.3. Drugi lokusi koji su povezani sa pemfigusom

Razvojem novih molekularnih tehnologija, moguće je analizirati genske polimorfizme koji nastaju zbog izmene pojedinačnih nukleinskih baza (*engl.* Single nucleotide polymorphism, SNP) a kako je celokupni genom zapravo sastavljen od fizički vezanih nukleinskih baza (SNP haplotipova), predispozicija odnosno udruženost ka razvoju autoimunskog pemfigusa mogla bi se odrediti na osnovu SNP markera haplotipa. Do sada je definisan veći broj gena izvan HLA lokusa čiji su pojedini aleli udruženi sa rizikom razvoja pemfigusa (geni koji kodiraju citokine, geni koji kodiraju imunoglobuline) [40, 45]. Različiti citokini učestvuju u patofiziologiji pemfigusa, imaju i regulatorna i efektorska dejstva. Na primer, IL-4, IL-10 i IL-13 su uključeni u diferencijaciju B limfocita i/ili produkciju antitela potklase IgG4. Polimorfizam regulatornih sekvenci gena koji kodiraju citokine utiču na nivo ekspresije citokina što je navelo razne autore da istražuju da li različite varijante gena za citokine (ili njihove receptore) utiču na moguću predispoziciju za razvoj pemfigusa [45].

1.2.4. Mehanizmi oštećenja tkiva u pemfigusu

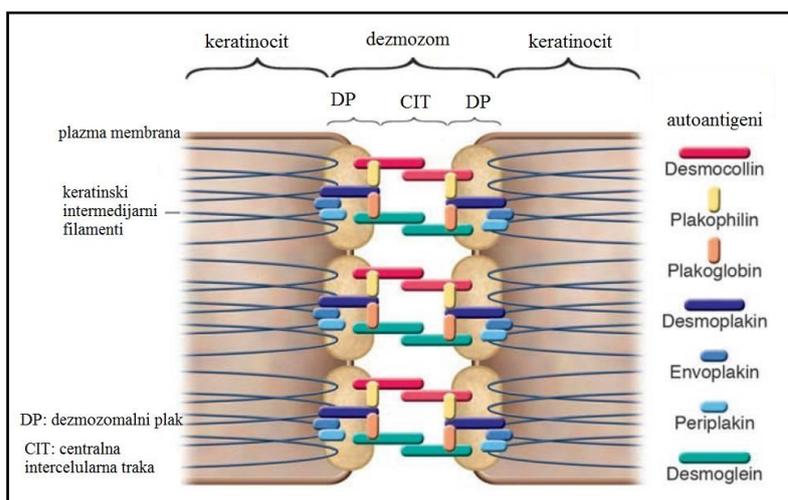
Osnovna promena kod pemfigusa je akantoliza nastala cepanjem međucelijskih spojeva-dezmozoma. Prvo dolazi do rastvaranja intercelularne supstance koja potom dovodi do razdvajanja dezmozoma, formiranja pukotina između ćelija koje se dalje šire formirajući bule [1]. Tačan proces koji dovodi do gubitka ćelijske adhezije i akantolize nije u potpunosti razjašnjen. Dosadašnja istraživanja su pokazala patogenost antitela specifičnih za intercelularne proteine s obzirom na sposobnost indukovanja akantolize u kulturi keratinocita kao i pojavu kliničkih i histopatoloških promena karakterističnih za pemfigus nakon pasivnog transfera kod neonatalnih miševa. Takođe, placentalni transfer antitela majke sa autoimunskim pemfigusom može kod novorođenčadi uzrokovati tranzitorne pemfigusne lezije [1]. Gubitak tolerancije prema Dsg3 od strane i B i T limfocita je potreban za efikasnu produkciju anti Dsg 3 antitela [62]. Glavni predloženi mehanizam koji bi mogao objasniti udruženost HLA molekula i pemfigusa jeste da aleli udruženi sa pojavom oboljenja mogu da vezuju dovoljnu količinu antigenskih peptida i iniciraju T ćelijski odgovor. Prezentacijom antitela autoreaktivnim T limfocitima dolazi do indukcije autoreaktivnih B ćelija na sekreciju patogenih antiDsg antitela [45].

1.2.4.1. Građa dezmozoma

Dezmozomi keratinocita su najvažniji međucelijski spojevi koji obezbeđuju funkcionalnu strukturu epiderma. Mehanizmi koji utiču na funkcionalnost dezmozoma predmet su brojnih istraživanja. Iako su funkcionalna svojstva adhezionih molekula dobro poznata, i dalje se malo zna o mehanizmima koji pokreću, održavaju ili dovode do gubitka kohezije ćelija. U sastav dezmozoma ulazi određeni broj glikoziliranih i neglikoziliranih proteina koji pripadaju adhezionim molekulima iz familije kadherina. Kadherini se dele u dve grupe - klasični kadherini (E, P, N kadherini) i dezmozomalni kadherini (dezmogleini i dezmokolini); svi kadherini se sastoje od aminokiselina sa kalcijum zavisnim mestima na njihovom ekstracelularnom domenu [63]. Ovi transmembranski proteini su homodimeri koji sa kadherinima na susednim ćelijama ostvaruju kalcijum zavisne veze [1, 64-66]. Postoje 2 različite vrste ovih transmembranskih glikoproteina, dezmoglein i dezmokolin (Dsc). Dezmozomi uvek u paru sadrže Dsg i Dsc. Dezmozomalni kadherini sadrže najmanje 4 izotipa Dsg (1-4) i 3 izotipa Dsc (1-3). Ekspresija Dsg1 i 3 je u pločasto slojevitom epitelu, a Dsg2 na običnom epitelu i miokardu [63]. To su kalcijum zavisni molekuli, sa velikim ekstracelularnim domenom, transmembranskim domenom i malim ekstracelularnim

domenom i smatra se da imaju direktnu ulogu u adheziji keratinocita [64, 67, 68]. Dezmozomi su povezani dezmozomalnim kadherinima na površini ćelije i intermedijarnim keratinskim filamentima sa unutrašnjim citoplazmatskim delom. N terminalni krajevi Dsg i Dsc su vezani jedan za drugi na ekstracelularnom delu dezmozoma dok su njihovi C terminalni domeni vezani sa plakoglobinom, plakofilinom i N terminalnim krajem dezmozoplakina za spoljašnji deo intracelularne dezmozomalne ploče (slika 3). C terminalni domeni dezmozoplakina su keratinskim filamentima vezani za unutrašnji deo intracelularne ploče [65, 68].

Ekstracelularni (EC) domen Dsg 3 se sastoji od 4 kadherinskih ponavljanja-EC1-4 i jednog proksimalnog domena (EC5) [69]. Prva 3 EC (EC1-3) Dsg3 su potrebna za vezivanje prva 2 EC Dsc (EC1-2) [68]. Glavna mesta vezivanja antitela otkrivena su na EC1 i EC2 domenima Dsg3, a opisano je vezivanje antitela i za domene EC3-5 [69].



Slika 3: Struktura dezmozoma
(Hertl i sar, 2006)

Drugi bitan molekul u patogenezi akantolize je *syndecan-1*, proteoglikan na površini keratinocita koji takođe učestvuje u ćelijskoj adheziji [70]. Fosforilacija i defosforilacija komponenti dezmozoma su najverovatnije najvažniji događaj u kaskadi regulatornih mehanizama koji utiču na održavanje strukture i očuvanje adhezivnih sposobnosti. Fosforilacija kadherina, katenina, dezmozoplakina i Dsg je obično udružena sa gubitkom adhezije [66]. Raznovrsni ćelijski procesi su uključeni u patogenezi pemfigusa, počev od vezivanja antitela za antigeni epitop do krajnje akantolize. Raslojavanje strukture dezmozoma je od najvećeg značaja.

1.2.4.2. Značaj T ćelija u nastanku anti Dsg antitela

Auto reaktivni T limfociti su ključni u indukciji i regulaciji sekrecije antitela. U suštini, sekrecija antitela zahteva prethodnu interakciju B i antigen specifičnih T helper limfocita, kako bi se determinisali izotipovi antitela koje će sekretovati B limfociti [71].

T helper ćelije se mogu, shodno profilu citokina, klasifikovati u T helper 1 (Th1) koje luče tip 1 citokina: (interleukin) IL-2, IL-12, IL-15 i interferon (IFN)- γ , i T helper 2 (Th2) koje luče IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13 (tip 2 citokina) koji učestvuju u aktivaciji B limfocita, odnosno oblikuju humoralni imunski odgovor u smislu izotipa i afiniteta sekretovanih antitela. IL-10, IL-6 i IL-15 su verovatno uključeni u patogenezu pemfigusa, a dokazana je smanjena količina IL 2, IFN- γ (zbog inhibitorne uloge IL-4 i IL-10) [71].

Budući da su različiti HLA aleli u različitim populacijama udruženi sa PV, glavni predloženi mehanizam je, da aleli udruženi sa pojavom oboljenja mogu da vezuju dovoljnu količinu antigenih peptida i iniciraju T ćelijski odgovor [37, 45, 72]. Interakcija T ćelijskog receptora (TCR) i MHC-peptidnog kompleksa predstavlja prvi korak koji pokreće T ćelijski odgovor. Aktivirani CD4⁺ T helper limfociti ekspimiraju CD40 ligand koji se vezuje za CD40 na površini B limfocita [73]. Aktivirani autoreaktivni B limfociti se takođe ponašaju kao APC omogućavajući T limfocitima prepoznavanje antigena i ova povratna sprega T-B limfocit putem kostimulatornih molekula je ključna u inicijaciji imunskog odgovora [73]. Prepoznavanje antigenog epitopa Dsg3 može biti ključan za sekreciju specifičnih antiDsg antitela od strane B limfocita.

1.2.4.3. Uloga antitela protiv dezmoглеina u oštećenju epitela

Razvoj oboljenja zavisi od potklase antitela. Raniji radovi ukazuju da su autoantitela IgG1 klase podjednako zastupljena i kod osoba sa pemfigusom (uglavnom u remisiji) i kod zdravih, dok su autoantitela klase IgG4 prisutna samo kod pacijenata u aktivnoj fazi bolesti dok prema novijim studijama, kod pacijenata u aktivnoj fazi bolesti, IgG4 i IgG1 antitela su bile dominantne potklase a kod pacijenata u kliničkoj remisiji antitela klase IgG2 i IgG4, kao i kod 60% zdravih srodnika [62]. Antitela ili fizički blokiraju adhezioni mesta na Dsg ili drugim adhezionim molekulima i narušavaju njegovu strukturu i/ili stimulišu oslobađanje proteolitičkih enzima [1]. Inflamatorna kaskada tokom nastanka i razvoja promena na koži nastaje interakcijom ćelija medijatora stečene i urođene imunosti.

Postoje 2 hipoteze kojim bi se mogli objasniti patomehanizmi nastanka bula kod pemfigusa. Prva je da vezivanjem autoantitela za antigeni epitop (Dsg) dolazi do mogućeg gubitka adhezije putem tzv. sternog otpora (*eng.* steric hindrance) - kad veličina grupa unutar molekula sprečava hemijsku reakciju koja se odvija sa srodnim manjim molekulima, odnosno sterno ometanje između susjednih grupa može takođe da ograniči torzione uglove veza [2, 74]. U skladu sa tim, brojne studije su pokazale da su sekvence aminokiselina na dva N-terminalna kraja ekstracelularnog domena Dsg 3 imunodominantna ali se i dalje ne zna zašto su ektodomeni (EC) 1 i 2 glavni ciljni antigen [75]. Autoantitela klase IgG prepoznaju linearne i konformacione epitope Dsg3 na N terminalnom kraju - 161 aminokiselina koje sadrže sekvence koje su ključne u adheziji kadherina [75].

Predloženo je da autoantitelo prema Dsg putem sternog otpora utiče na adhezivna svojstva Dsg dovodeći do razdvajanja strukture dezmozoma. Prema novijim istraživanjima iako antitela vezana za Dsg putem sternog otpora inhibiraju adhezivna svojstva Dsg, smatra se da nisu dovoljna da bi dovela do cepanja dezmozoma [74].

Druga hipoteza koju su 1999. godine predložili Stanley i Amagai, tzv. dezmoglein kompenzatorna teorija podrazumeva da se adhezija između keratinocita održava dokle god ili Dsg1 ili Dsg 3 funkcionišu, odnosno dovoljan je jedan funkcionalni izoformni oblik za održavanje integriteta kože i sluznica [63, 76]. Postulati ove teorije su: 1) u superficijelnom epidermu pemfigus foliaceusa (PF) gde je prisutan samo Dsg1, antiDsg1 antitela će prouzrokovati bule, 2) antiDsg 3 antitela su sama dovoljna da dovedu do rascepa na oralnoj sluzokoži kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom (PV) kod kojih nije prisutan Dsg1, 3) kutane lezije kod pacijenata sa PV se razvijaju kada su prisutna i antiDsg1 i antiDsg3 antitela [62, 63]. Dezmoglein kompenzatorna teorija ne uzima u obzir ostale kadherine [62].

1.2.4.4. Antitela protiv drugih proteina i ostali mehanizmi koji izazivaju akantolizu

Istraživanja su pokazala da pored antitela na Dsg, pacijenti oboleli od pemfigusa razvijaju antitela i prema drugim komponentama dezmozoma (kao što su dezmokolin, familija plakina) ili prema nedezmomalnim proteinima kao što su tiroperoksidaza, neki aneksini, laminin. Do sada je identifikovano preko 50 humanih proteina koji reaguju sa pemfigusnim IgG [62, 76].

Od značaja je nedavno dokazana reaktivnost prema proteinu nazvanom PERP iz familije perifernog mijelinskog proteina (*eng.* peripheral myelin protein, PMP). Moguća je njegova

uloga u interakciji adaptornih proteina i receptora koji aktiviraju kaspazu (proapoptotski enzim) [62].

U studiji Vuu i saradnika, radioimunoprecipitacijom seruma pokazano je da je 85% pacijenata sa pemfigusom precipitalo ACh receptore [62, 77]. Acetilholin (ACh) može da utiče na funkciju keratinocita vezujući se za različite klase ACh receptora - muskarinski i nikotinski holinergički receptori. Na površini humanih keratinocita izolovano je više vrsta muskarinskih (M1-M5) (mAChR) i nikotinskih ($\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9, \alpha 10, \beta 1, 2, 4$) ACh receptora (nAChR) i ovi receptori sinergistički učestvuju u održavanju ćelijske adhezije. Blokiranjem bilo koje klase ACh receptora izaziva gubitak kohezije *in vitro* [62, 66, 78, 79]. Muskarinski AChR su transmembranski glikoproteini koji putem G proteina modulišu koncentraciju jona i aktivnost protein kinaza a nAChR putem vezivanja za jonske kanale modifikuju protok natrijuma, kalijuma i kalcijuma.

Dva nova potencijalna antigena koja su otkrivena na površini keratinocita pripadaju grupi holinergičkih receptora: *pemphaxin* (molekul sličan aneksinu koji vezuje ACh) i $\alpha 9$ acetilholin receptor, i od skorije i Dsg 4 [62, 71, 80].

1.2.4.5. Predloženi modeli oštećenja

Postojanje antitela prema različitim komponentama keratinocita u patogenezi pemfigusa mogla bi se objasniti tzv. “*multiple hit*” hipotezom: anti-AChR antitela indukuju akantolizu smanjenjem kohezije zbog inhibicije fiziološke kontrole oblika keratinocita i međućelijskih veza; keratinociti se smanjuju (retrahuju), dezmozomi sa adhezionim molekulima su ogoljeni u intercelularnom prostoru, za njih se vezuju antitela i sprečava se ponovna kohezija dezmozoma putem sternog otpora; prema ovoj teoriji težina kliničke slike i prezentacija zavise od odnosa različitih tipova autoantitela kod pacijenta [62, 79].

Uprkos otkrivanju dodatnih potencijalnih autoantitela, patogena uloga autoantitela prema Dsg1 i Dsg3 jasno je definisana a svakako sinergističko dejstvo antitela prema različitim antigenim epitopima pojačava indukciju akantolize [71, 81, 82]. Kod nekih pacijenata dokazana su i antimitohondrijalna antitela za koja se smatra da bi mogla da prodru u keratinocite i reaguju sa mitohondrijalnim proteinima delujući sinergistički sa drugim antitelima koja se razvijaju kod pemfigusa [62, 76, 83].

Sve ovo ukazuje na kompleksnost pemfigusa i da najmanje tri vrste antitela (antidezmozomalna, anti acetilholinska i antimitohondrijalna) mogu da pokrenu razvoj oboljenja uz različite tkivne i serumske faktore kao što su FasL (Fas ligand), TNF (*eng.* Tumor necrosis factor), citokini, proteaze [76, 83].

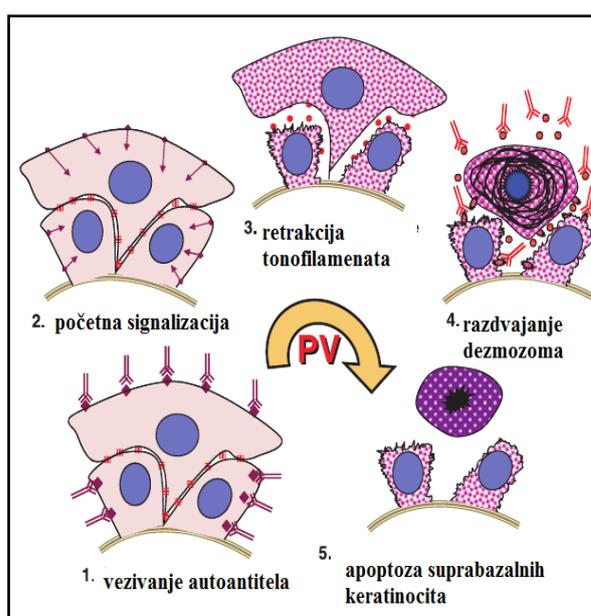
Drugi medijatori inflamacije uključujući prostaglandine, tromboksan B2 i leukotrijene se takođe mogu naći u većoj količini u pemfigusnoj buli. Smatra se da je nivo TNF u serumu obolelih u korelaciji sa stepenom aktivnosti bolesti [62, 84]. Nije do kraja jasna uloga TNF u patogenezi pemfigusa. Mogao bi imati višestruku ulogu s obzirom na njegove razne efekte na imunski odgovor kao što su indukcija sekrecije preteolitičkih enzima, naročito urokinaze, plazminogen aktivatora kao i sintezu C3 komponente komplementa u keratinocitima [84].

Kada se autoantitelo IgG klase veže za Dsg na površini keratinocita dolazi do aktivacije nespecifičnih proteaza i tranzitornog porasta intracelularnog kalcijuma usled brzog porasta Inozitol 1, 4 i 5 trifosfata koji mobilise intracelularni kalcijum [49]. Fosfolipaza C katalizuje stvaranje dodatnih količina inozitol 3 fosfata i menja odnos cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) i cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) [77]. Krajnji odgovor keratinocita koji dovodi do akantolize je ekspresija plazminogen aktivatora na površini keratinocita i sekrecija ovog molekula sa aktivacijom plazminogena koji zatim prelazi u plazmin i aktivira druge proteolitičke enzime (serin, karboksil peroksidazu). Ovi enzimi razdvajaju intercelularni matriks i dovode do gubitka ćelijskih veza [49]. Pored toga, dolazi do aktivacije kaskadnih signalnih puteva: fosforilacije p38 mitogen aktivirane fosfokinaze (MAPK) i *heat shock proteina* (HSP), autofosforilacije receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR), (*eng.* Epidermal growth factor, EGF), aktivacije c-myc (regulatorni gen koji kodira transkripcioni faktor) i transkripcionog faktora c-Jun i integracije EGFR i plakoglobina [62, 80, 85, 86].

Postavljena je hipoteza da bi i apoptoza keratinocita mogla biti odgovorna za nastanak akantolize [87-89]. Akantoliza i apoptoza se ne mogu razdvajati kod PV s obzirom da su oba mehanizma pokrenuta istim signalnim efektorima zbog vezivanja antitela na keratinocite i učešća istih medijatora - FasL, TNF, IL-1, IL-6, IL-8 i IL-15 i proteaza. Najverovatnije je apoptoza u akantolizi regulisana EGF [80].

2009 godine, Grando i saradnici su predložili novi pojam - apoptoliza (*apoptolysis*) koja se od apoptoze razlikuje po tome što ne dolazi do smrti ćelija bazalnog sloja, ćelije se skupe (retrahuju) i to daje izgled nadgrobničkih spomenika što je karakterističan histopatološki nalaz

kod pemfigusa [67, 90]. Autori su predložili nekoliko koraka apoptolize. Vezivanjem autoantitela za Dsg ili neke druge proteine na površini keratinocita dolazi do početne signalizacije. Aktivacijom EGFR, p38 MAPK, Src, protein kinaza mTOR (*eng.* Mammalian Target of Rapamycin) dolazi do porasta intracelularnog kalcijuma što daljom enzimskom kaskadom započinje apoptozu keratinocita u bazalnom i nižim slojevima epiderma. Dolazi do propadanja i retrakcije tonofilamenata, kao i do razdvajanja inter-dezmozomalnih adhezivnih kompleksa (zbog fosforilacije adhezivnih molekula i razdvajanja citoplazmatskih krajeva transmembranskih kadherina pod dejstvom aktiviranih kaspaza) odnosno do rane akantolize. U ovoj fazi dezmozomalni spojevi još uvek drže keratinocite. Daljim razdvajanjem i značajnim propadanjem strukturnih proteina uključujući i Dsg dolazi do prave akantolize i potpunog razdvajanja keratinocita. Nakon toga dolazi do zaobljavanja keratinocita i apoptoze suprabazalnih keratinocita, a bazalni sloj je očuvan (slika 4) [90]. Dokazano je u različitim istraživanjima da inhibitori protein kinaze Src, EGFR, p38 MAPK, kaspaza i mTOR blokiraju i akantolizu i apoptozu [62, 83, 90, 91].



Slika 4: Apoptoliza kod pemfigusa
(Grando i sar, 2009)

U proces akantolize može da bude uključena i aktivacija komplementa ali je njegova uloga manje važna. Smatra se da komplement pojačava patogenost tako što autoantitela vezuju komponente komplementa na površini ćelije, što može imati za posledicu oslobađanje medijatora inflamacije, najčešće IL-1 i TNF i aktivaciju proteolitičkih enzima [49, 80].

Razlike u kliničkoj prezentaciji superficijalnih i dubokih formi pemfigusa su najverovatnije odraz regionalnih varijacija ekspresije ciljnih antigena. Dsg 1 je pretežno prisutan u gornjim slojevima epiderma a nedostaje u suprabazalnom sloju dok je Dsg3 pretežno ispoljen u dubljim slojevima a nedostaje u gornjim slojevima epiderma [1, 2, 37, 49, 63]. Ova zapažanja su doprinela razvoju Dsg kompenzatorne teorije. Opet, ova teorija ne objašnjava nepostojanje bula kroz druge slojeve epiderma kod manjeg broja pacijenata koji imaju i antiDsg1 i 3 antitela [1]. Svakako se smatra da do akantolize dolazi prvenstveno zbog inhibicije adhezivnih funkcija Dsg3 i Dsg1, a da sekrecija plazminogena kao i aktivacija komplementa mogu biti naknadno uključeni u proces i doprinostiti daljem razvijanju akantolize [49].

1.2.5. Faktori spoljašnje sredine

Dosadašnja istraživanja su dokazala da kod genetski predisponiranih osoba različiti faktori spoljašnje sredine mogu pokrenuti razvoj autoimuskog pemfigusa ili ga pogoršati [38]. Mogućnost da određeni faktori spoljašnje sredine indukuju pemfigus ili dovode do njegove egzacerbacije kod genetski predisponiranih osoba, od velikog je značaja zbog toka bolesti i efikasnosti primene terapije. Populacije sa sličnom genetskom predispozicijom mogu ispoljavati različite kliničke manifestacije oboljenja kada se izlažu različitim faktorima spoljašnje sredine [92]. Iako je dokazana patogena uloga antiDsg antitela, razvoj oboljenja zavisi od izloženosti mogućim okidačima s obzirom da se antitela mogu čak i u visokom titru naći i kod zdravih osoba kao i kod zdravih srodnika pacijenata obolelih od pemfigusa [38].

Predložen je akronim PEMPHIGUS, kako bi se označili brojni mogući etiološki faktori-pesticidi, hormoni, malignitet, lekovi, hormoni, infekcije, hrana, UV zračenje i stres (*eng. PE: pesticides, M: malignancy, P: pharmaceuticals, H: hormones, I: infections, G: gastronomy, U: UV radiation, S:stress*) [93].

Do sada najčešće opisivani i najjasnije povezani faktori spoljašnje sredine koji dovode do manifestacija autoimuskog pemfigusa su lekovi, i mogu se podeliti u tri velike grupe- 1) lekovi sa tiolskom grupom, 2) lekovi sa fenolskom grupom, 3) netiolski, nefenolski lekovi [94-97]. Može se govoriti o lekom pokrenutom (*eng. drug- triggered pemphigus, DTP*) i lekom izazvanom (*drug- induced pemphigus, DIP*) pemfigusu, koji se na osnovu kliničkih i patohistoloških manifestacija ne razlikuju od idiopatskih formi pemfigusa, a DIP i DTP će se razlikovati po toku nakon obustave leka [36, 98]. Prvi slučaj pemfigusa izazvanog lekom - penicillaminom opisan je 1969. godine [46]. Pretpostavlja se da će se u oko 7% pacijenata

koji su na terapiji penicilaminom najmanje 6 meseci razviti pemfigus, i do sada najveći broj opisanih lekova izazvanog pemfigusa bio je kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom lečenih penicilaminom [46, 99]. Drugi često opisivani lekovi su penicilin i kaptopril: penicilin spada u grupu tzv. maskiranih tiol lekova, sadrži S atom koji može biti pretvoren u tiol [94]. Penicilamin nastaje hidrolizom metaboličkih produkata penicilina i tragovi penicilamina se mogu naći u plazmi pacijenata sa penicilin DIP [36]. Cefalosporini sadrže i tiolsku grupu i fenolski prsten, takođe su opisivani kao pokretači pemfigusa [100].

Period potreban za kliničko manifestovanje oboljenja indukovano lekom je dosta dug (i preko šest meseci, u proseku 314- 329 dana, odnosno kraće ako se govori o *DI pemphigus vulgaris*, 128 dana), što ponekad može dovesti u sumnju medikamentoznu etiologiju [36, 95]. Predloženi mehanizam indukovanja akantolize kod lekova sa fenolskom grupom je oslobađanje citokina, prvenstveno IL-1 i TNF od strane keratinocita [70, 97, 98]. Takođe, pojedini lekovi mogu uticati na aktivnost supresornih T limfocita što će omogućiti sekreciju raznih antitela od strane B limfocita [36, 101]. Postoje pojedinačni slučajevi pemfigusa izazvanog lekom nakon upotrebe drugih ACE inhibitora (fosinopril, lizinopril), hlorokina, indapamida, karbamazepina, hinolona [101-106].

Najčešće opisivani lekovi koji mogu da pokrenu ili pogoršaju pemfigus navedeni su u tabeli 1.

Tabela 1: Lekovi koji mogu da pokrenu ili pogoršaju pemfigus

Lekovi
Penicilin i derivati penicilina
Cefalosporini
ACE inhibitori
Tuberkulostatici (Etambutol, Isoniazid, Rimfapicin)
Soli zlata
Penicilamin

Neke namirnice takođe mogu imati ulogu u nastanku ili pogoršanju pemfigusa, naročito one bogate jedinjenjima koja sadrže tiol (kao što je luk - crni, beli i praziluk), fenol (mango, pistači, indijski orah, crni biber, aditivi), izotiocianite (senf, ren, rotkva, prokelj, brokoli) ili tanin (crno vino, brusnice, maline, kupine, začini) [97, 99, 107, 108]. Tome govori u prilog da

je incidencija pemfigusa viša u određenim populacijama gde se takve namirnice upotrebljavaju u većoj količini, kao i da su zabeleženi slučajevi pogoršanja ili recidiva nakon upotrebe većih količina neke od navedenih namirnica [92, 93, 99, 108].

Ostali faktori spoljašnje sredine koji su opisivani u literaturi kao faktori koji kod genetski predisponiranih osoba dovode do indukcije ili aktivacije pemfigusa su pesticidi, hormoni, fizički agensi (jonizujuće i UV zračenje) [82, 92, 93, 97, 109].

U dečjem uzrastu lekom indukovan pemfigus je redak, opisani su slučajevi pemfigusa kod dece nakon terapije montelukastom koji je selektivni antagonist leukotrien D4 receptora i sadrži sumporni molekul, kao i pemfigus u dečjem uzrastu nakon imunizacije [32].

Zabeleženi su slučajevi pemfigusa kontaktno nastalih nakon topikalne upotrebe fenolskih supstanci, različitih kozmetičkih preparata ili imikvimoda [97, 99, 110-112].

Različiti infektivni agensi (virusi prvenstveno) mogu inicirati ili pogoršavati pemfigus. Infektivni agens može kod predisponiranih da stimuliše imunski odgovor i da dovede do produkcije IFN- γ i citokina – IL-4 i IL-10 [97]. IFN- γ može dovesti do pojačane ekspresije HLA molekula II klase na površini keratinocita, a povećana produkcija IL-4 i IL-10 potenciranje Th2 imunskog odgovora i sekreciju antitela. Virusni mogu imati direktan uticaj na T i B limfocite dovodeći do aktivacije autoreaktivnih B limfocita i sekrecije antitela ili infekcija može dovesti do strukturnih promena proteina ćelijske membrane i formiranja novih imunogenih antigena [113]. Takođe, herpes simplex virusi mogu indukovati sekreciju autoantitela putem molekularne mimikrije [97]. Opisani su slučajevi egzarcercbacije pemfigusa nakon primanja vakcina (DiTePer, vakcina protiv gripa, hepatitis B vakcine [114, 115].

Sa druge strane, zabeleženo je značajno manje pušača među pacijentima sa pemfigusom kao i poboljšanje ugl. oralnih lezija, odnosno agravacija bolesti nakon prestanka pušenja. Nikotin utiče na produkciju određenih proinflamatornih citokina, a vezivanjem za nikotinske holinergičke receptore na površini keratinocita utiče na održavanje ćelijske kohezije [82, 92, 116].

Stres i stresni događaji takođe mogu biti okidači različitih autoimunskih bolesti uključujući i pemfigus, u prilog tome govori i povećana incidencija pemfigusa u posleratnom periodu [4, 30, 117].

Budući da je pemfigus oboljenje koje se najčešće javlja u 4. i 5. dekadi života, ređe su zabeleženi slučajevi kod trudnica [118]. Iako je dokazano pogoršanje pemfigusa u trudnoći, nije dokazana statistički značajna razlika u odnosu na broj trudnoća kod obolelih pacijentkinja u dosadašnjim ispitivanim serijama [82, 92]. Kod genetski predisponiranih osoba, trudnoća se smatra jednim od faktora okidača odnosno pogoršanja oboljenja [119-121]. U trudnoći, pogoršanja pemfigusa uglavnom su manjeg obima, u 1. i 2. trimestru, značajnije pogoršanje se dešava postpartalno [35, 118, 121, 122]. Smatra se da zbog blage imunosupresije tokom trudnoće i zbog horionske produkcije kortikosteroida u trećem trimestru dolazi do poboljšanja kliničkih manifestacija majki sa pemfigusom, a zbog prekida transplacentarnog dotoka kortikosteroida nakon porođaja dolazi do pogoršanja odnosno recidiva [35, 118, 120].

1.3. Klasifikacija pemfigusa

Uobičajena je podela autoimunskog pemfigusa u dve grupe u zavisnosti od nivoa rascepa - *pemphigus vulgaris* i *pemphigus foliaceus*, svaki sa svojim varijantama (*pemphigus vegetans* i *pemphigus erythematosus*) [123].

Današnja klasifikacija oboljena iz grupe pemfigusa zasnovana je na 1) vrsti ciljnog antigena (Dsg, Dsc ili drugi), 2) nivou rascepa, 3) tipu autoantitela (IgG ili IgA), 4) histopatološkim karakteristikama (odsustvo ili prisustvo inflamacije, i/ ili nekroze) i 5) kliničkim manifestacijama oboljenja [124, 125].

Klasifikacija autoimunskog pemfigusa, ciljni antigeni i glavne histološke karakteristike navedeni su u tabeli 2.

Tabela 2: Klasifikacija oboljenja iz grupe autoimunskog pemfigusa

Tip pemfigusa	Ciljni antigen	Histološke karakteristike
Pemphigus vulgaris (PV)		
1. Mukozni oblik PV	Dsg3	Suprabazalni rascep
2. Mukokutani oblik PV	Dsg3, Dsg1	Rascep suprabazalno/ granulozni sloj
3. Pemphigus vegetans	Dsg3	Suprabazalni rascep, akantoza, papilomatoza, Eo i Ne infiltrat
Pemphigus foliaceus	Dsg1	Rascep u granuloznom sloju
Pemphigus herpetiformis	Dsg1, Dsg3	Eozinofilna spongioza
IgA pemphigus	Dsc1, Dsg1	Subkornealni rascep i subkornealne pustule
Pemphigus paraneoplasticus	Dsg 3, plektin, BPAG1, dezmozoplakin 1, 2, envoplakin, peptid 170 KDa	Nekroza keratinocita

1.4. Klinička prezentacija

1.4.1. Pemphigus vulgaris (PV)

PV predstavlja najčešću formu pemfigusa. Promene su lokalizovane na koži i sluzokožama. Bule se obično javljaju na klinički neizmenjenoj koži, ređe na eritematoznoj. Po prskanju krova bule zaostaju erozije koje su bolne, lako krvare i sporo epitelizuju [2]. Bule su skoro uvek prisutne na mestima izloženim pritisku. U početku su bule malobrojne, javljaju se spontano ili pod dejstvom pritiska (pozitivan fenomen *Nikolsky*), nepravilno su raspoređene u manjim i većim pregibnim površinama - oko očiju, nozdrva, usta, u predelu umbilikusa, grudi na ekstremitetima i kapilicijumu [2]. Tip i izgled promena na sluzokožama analogan je onima na koži, ali se intaktne bule retko viđaju. Najčešće je zahvaćena oralna sluzokoža, i u 50-63% slučajeva se javljaju pre promena na koži nekoliko meseci i označavaju početak bolesti [2, 5]. Pored oralne mogu biti zahvaćene druge sluzokože. Na konjunktivama se bule ređe viđaju [5].

PV u dečjem uzrastu i juvenilni PV su izuzetno retki [33]. Klinička slika, tok i prognoza vrlo su slični PV kod odraslih [32, 34, 126, 127].

1.4.2. Pemphigus vegetans (P Veg)

Predstavlja najređi oblik pemfigusa, javlja se u oko 1 - 2% do 5% pemfigusa [128]. Klinički se deli na tip *Neumann* i tip *Hallopeau* koji se razlikuju se na osnovu kliničke prezentacije i toka bolesti [128]. Tip *Neumann*: primarne promene su bule, iza njih zaostaju velike erodovane površine na kojima se potom stvaraju vegetacije. Predilekciona mesta su uglavnom pregibne površine [5]. Mukoze su takođe zahvaćene, isto tako često kao kod *pemphigus vulgaris*. Tip *Hallopeau*: početna promena je pustula. Javljaju se grupe pustula koje brzo evoluiraju u vegetantne verukoidne plakove bez stvaranja erozija. Na površini ovih plakova mogu se videti male pustule i ređe male erozije [128-130]. Tok je benignan, vrlo su česte spontane remisije [128]. Promene se isto javljaju u intertriginoznim regijama. Mogu se naći slične lezije u usnoj duplji kao kod P Veg *Neumann*.

Oba tipa P veg su izrazito retka u dečjem uzrastu i u juvenilnom dobu [126].

1.4.3. Pemphigus foliaceus (PF)

Javlja se ređe od PV, čini oko 7 - 20% svih slučajeva autoimunskog pemfigusa [6, 8, 10, 11, 15, 19, 23], a zastupljen je u većem procentu u zemljama Afrike [17, 28]. Predstavlja superficijelni oblik. Male, mlitave bule se javljaju u ranom stadijumu, vrlo brzo prskaju, kliničkom slikom dominiraju eritem, erozije, krustoskvame. Promene su u početku ograničene na seboroične regije, imaju tendenciju da se generalizuju. Promene na konjunktivama su česte dok su druge sluzokože izuzetno zahvaćene [5].

U dečjem dobu se retko javlja, češća je forma od PV a klinička slika, tok i prognoza odgovaraju adultnoj formi [32, 126].

Endemska forma PF javlja se u Brazilu (*Pemphigus Braziliensis*, *Fogo selvagem*) [5]. U pojedinim ruralnim područjima prevalencija oboljenja iznosi oko 3-4% [4]. U Brazilu od endemske forme PF najčešće oboljevaju mlađi odrasli muškarci i deca [5]. Sezonski pik incidencije endemske forme PF i geografska zastupljenost postavljaju hipotezu okidača iz spoljašnje sredine koji je u molekularnoj mimikriji sa Dsg1. Tome ide u prilog činjenica da je opisana visoka prevalencija antiDsg1 antitela kod zdravih osoba koje žive u predelima gde se javlja endemski PF [5]. Zabeležene su i forme endemskog pemfigusa u severnom delu Kolumbije, Peru i južnom delu Tunisa, gde za razliku od brazilske forme, oboljevaju mlade žene [5, 131].

1.4.4. Pemphigus erythematosus (PE)

Promene na koži mogu biti bule, eritemoskvamozni plakovi aspekta seboroičnog dermatitisa i lezije koje podsećaju na malarni eritem kod *lupus erythematoses* (LE). Bule, kao i kod PF vrlo brzo prskaju, stvarajući erozije prekrivene žućkasto mrkim krustama. Promene su najizraženije na kapilicijumu, nazolabijalno, mamarno, submamarno i na ramenima [2, 100, 132]. Na nosu i zigomatično javljaju se promene nalik LE – eritem, erodovane površine prekrivene krustoskvamama, koje mogu biti suve i adherentne i klinički podsećati na skvamu kod LE. Mukoze kod pacijenata sa PE nisu zahvaćene [132].

Kod pacijenata obolelih od PE u mogu se naći autoantitela na Dsg1 kao kod PF i antinuklearna antitela kao kod LE, kao i imunopatološki nalazi karakteristični za oba oboljenja mada su retki slučajevi sa kliničkim i imunološkim manifestacijama obe bolesti [100, 132].

1.4.5. Pemphigus herpetiformis (PH)

Originalan naziv i dijagnostičke kriterijume dala je Jablonska 1975. godine [123]. PH se javlja u 2,2 - 7,3% svih pemfigusa [4, 8, 11, 123]. Promene su herpetiformnog rasporeda. Primarna promena je bula uglavnom napeta, često na eritematoznoj površini. Često se viđaju i vezikule, papule ili papulovezikule, urtikarijalni plakovi, ponekad sa manjim bulama herpetiformnog rasporeda na periferiji plakova. Subjektivno, prisutan je osećaj pruritusa [123]. Histološke i imunopatološke karakteristike su kao za PV.

1.4.6. IgA pemphigus

Postoje dve podgrupe IgA pemfigusa - SPD tip (subkornealna pustulozna dermatiza) i IEN tip (intraepidermalna neutrofilna dermatiza) [123, 133]. Do 2011. godine, opisano je 60ak slučajeva IgA pemfigusa [133], odnosno 37 IgA pemfigusa SPD tipa i 30 IEN tipa [134]. Primarne promene su male, mlitave bule, koje brzo prelaze u pustule, ili pustule, na eritematoznoj ili klinički neizmenjenoj koži. Pustule konfluiraju, šire se, formiraju anularna i policiklična polja sa žućkastim krustama u centru i pustulama na periferiji. Predilekciona mesta su pregibi (predominantno aksile) i trup. Mukoze su retko zahvaćene [133, 134].

Kod SPD tipa, IgA depoziti se direktnim imunofluorescentnim testom nalaze samo u gornjim slojevima epiderma dok kod IEN tipa celom širinom. Dsc 1 je identifikovan kao ciljani antigen

i u nekoliko slučajeva IEN tipa IgA antitela prema Dsg3 i Dsg1 [123, 133]. Opisani su pojedinačni slučajevi IgA pemfigusa u dečjem dobu [123].

1.4.7. Pemphigus paraneoplasticus (PNP)

O udruženosti oboljenja iz grupe pemfigusa i malignih oboljenja postoje mnogi podaci. Anhalt i saradnici su 1990. godine opisali kao poseban entitet PNP – autoimuno akantolitično mukokutano oboljenje udruženo sa raznim malignitetima [123]. PNP je najčešće udružen sa limfoproliferativnim oboljenjima [123, 135]. Kliničke karakteristike PNP su refrakterni stomatitis i polimorfizam kutanih lezija koje se manifestuju bulama, vezikulama, target lezijama u čijem centru se često viđa bula, urtikarijalnim plakovima i/ ili psorijaziformim plakovima; opisani su i slučajevi sa erupcijom na koži nalik *lichen planusu*, odnosno *lichen planus pemphigoidesu* [62, 135].

S obzirom na varijabilnu kliničku prezentaciju i simptomatologiju, i zbog do sada postavljenih jasnih razlika sa PV, predložen je naziv PNP/ PAMS (*eng.* Paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome, PAMS) [62, 97, 135, 136].

Promene se najčešće javljaju prvo na sluzokožama u vidu bolnih, prostranih erozija i ulceracija, najčešće na oralnoj sluzokoži, zahvatajući i orofarinks. Konjunktivalne erozije su za razliku od PV vrlo česte, razvija se pseudomembranozni konjunktivitis, ne retko dolazi do ožiljavanja; i druge sluzokože mogu biti zahvaćene - gingive, jezik, ezofagus, larings, vagina i penis [123, 135]. Kod PNP često je zahvaćena mukoza respiratornog trakta izazivajući *bronchiolitis obliterans* koji završava letalnim ishodom i koji je najčešći uzrok smrti kod pacijenata sa PNP [62]. Bule na dlanovima i tabanima se često viđaju za razliku od PV [123, 135]. U 70% slučajeva PNP se javlja kod pacijenata sa već dijagnostifikovanom neoplazijom, u ostalih 30 % se otkrije naknadno i za razliku od drugih formi pemfigusa, uprkos terapiji smrtnost je preko 90% [62, 123].

PNP kod dece je najčešće udružen sa limfoproliferativnim oboljenjima, uglavnom. Non-Hodgkin-ovim limfomom i češće sa Castelman-ovim tumorom [32, 137].

1.5. Dijagnoza

Dijagnoza autoimunskog pemfigusa postavlja se na osnovu korelacije kliničkih manifestacija, histopatološkog nalaza i imunofluorescentnih testova: imunopatološkog nalaza (direktni imunofluorescentni test, DIF), indirektnog imunofluorescentnog testa (IIF) i imunoadsorbcijskih testova. Kao pomoćna dijagnostička procedura za rano i brzo otkrivanje akantolitičnih ćelija koristi se citodijagnostički Tzanckov test.

1.5.1. Histopatološke promene

Osnovna karakteristika oboljenja iz grupe pemfigusa je i formiranje intraepidermalnog rascepa - šupljine u kojoj se često nalaze morfološki karakteristične akantolitične ćelije, sa eozinofilnom citoplazmom, piknotičnim jedrom i perinuklearnim haloom [138]. Histopatološka podela pemfigusa može da se izvrši na osnovu nivoa na kom je nastao rascep na PV - suprabazalni, PF, PE - predominantno gornji slojevi epiderma.

Kod PV bazalne ćelije ostaju vezane za bazalnu membranu, ali zbog gubitka intercelularnih veza izgleda su "reda nadgrobnih spomenika"; perivaskularno i u intersticijalnom prostoru može se naći oskudan do umeren limfocitni infiltrat, eozinofili i/ ili neutrofilni [138]. U ranim lezijama često nema akantolize, može se videti eozinofilna spongioza [138].

Histopatološka slika P Veg je slična ali se često nalaze akantoza, papilomatoza, i ponekad intraepidermalne šupljine (abscesi) ispunjeni eozinofilima [138].

Histološka slika PH je često nespecifična. Najčešće se viđa infiltracija epiderma neutrofilima i ponekad i eozinofilima. Ponekad se mogu videti i mikroabscesi u papilarnom dermu ispunjeni neutrofilima [138]. Kod IgA pemfigusa prisutna je subkornealna bula (SPD tip) ili bula u spinosnom sloju (IEN tip). Kod oba tipa prisutne su akantolitične ćelije i različit broj neutrofila. U ranim lezijama se takođe može naći i neutrofilna spongioza.

Histopatološka slika PNP je varijabilna. Predstavlja kombinaciju pemfigus vulgarisa i *erythema exsudativum multiforme*, *lichen planusa* i pemfigoida [135, 138]. U suštini, vidi se *interface dermatitis* i nekroza keratinocita, uz retke akantolitične ćelije [138]. Razlikuju se tri histološke slike PNP: 1) intraepidermalna, suprabazalna akantolitična bula, 2) suprabazalna akantolitična bula i vakuolarna degeneracija bazalnog sloja i 3) interface dermatitis sa ili istanjenim ili lako hiperplastičnim epidermom, uz vakuolnu degeneraciju bazalnog sloja,

često uz hipergranulozu, nekrozu keratinocita i gust limfocitni infiltrata u gornjem sloju derma [135, 138].

1.5.2. Direktni imunofluorescentni test (DIF)

DIF je rutinska dijagnostička metoda oboljenja iz grupe pemfigusa. Izvodi se perileziona, pozitivan je kod svih pacijenata sa autoimunskim pemfigusom. DIF testom se detektuju autoantitela IgG klase na površini keratinocita i ređe depoziti C3c [136, 139-141]. Imunoreaktanti se nalaze celom širinom epiderma, ponekad nešto intenzivnije u donjim slojevima, odnosno kod superficijelnih formi pemfigusa u gornjim partijama epiderma [136]. Kod PE, pored karakterističnih depozita IgG i C3c u intercelularnim prostorima, ovi imunoreaktanti se takođe nalaze duž zone bazalne membrane, u vidu granularnih depozita kod 20 – 80% obolelih, izraženije na fotoeksponiranoj koži. Kod IgA pemfigusa antitela se kod SPD tipa nalaze u gornjim slojevima epiderma, kod IEN tipa, ili kroz ceo epiderm ili u donjim slojevima [136]. Kod PNP nalaze se intercelularni depoziti IgG i C3c u 90 – 100 % slučajeva, a nalaze se i depoziti C3c duž zone bazalne membrane u 70-80% [136, 142].

DIF test se može izvoditi i na preparatu (sadržaj bule) bojenom po Tzancku [143, 144]. Oko akantolitičnih ćelija nalaze se fluorescirajući depoziti IgG. Senzitivnost je niža u odnosu na DIF perileziona kože što autori dovode u vezu sa dužinom trajanja bolesti, prisustvom ili odsustvom inflamatornih ćelija u razmazu dna bule i tipom autoimunskog pemfigusa [144].

Takođe je moguće izvesti DIF test spoljašnjeg omotača dlake uglavnom sa kapilicijuma kao manje invazivnu metodu od DIF testa perileziona kože [145, 146]. Pločasto slojevit epitel koji oblaže dlaku je analogan epidermu i u kapilicijumu je visoka ekspresija Dsg [145, 147]. Pojedini autori ukazuju na visoku senzitivnost i specifičnost DIF testa anagene dlake, koji je pozitivan u 83-100% pacijenata sa pemfigusom [145-148]. DIF test je korisno pomoćno sredstvo prilikom odlučivanja o daljoj terapiji i obustavi lečenja kod pacijenata u remisiji jer se smatra da negativan DIF test kod pacijenata u remisiji ukazuje na minimalni rizik relapsa oboljenja. Takođe, zbog minimalne invazivnosti i metode i visoke senzitivnosti, prema novijim studijama savetuje se da se pacijentima ponavlja DIF test dlake [146, 149, 150].

1.5.3. Indirektni imunofluorescentni test (IIF)

IIF testom se određuje prisustvo autoantitela u serumu obolelih. U zavisnosti od supstrata koji se koristi (ezofagus majmuna, humana koža, jednjak zamorca, usna kunića), test je pozitivan

kod 75 - 90% pacijenata [136, 151]. Korišćenjem dva supstrata kao što su humana koža i jednjak majmuna senzitivnost testa raste do čak 100% [136]. Bešika pacova kao prelazni epitel koji je bogat plakinima je supstrat koji se koristi za IIF test kod PNP [136]. Pozitivan IIF test na bešici pacova može se naći i kod određenog broja PV [152].

IIF test može biti negativan u ranim stadijuma bolesti ili u ekstenzivnim slučajevima pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa [151]. Praćenje dinamike titra pemfigusnih autoantitela koristan je prognostički pokazatelj [139, 151].

Preko 40 godina unazad proučavanja su usmerena na određivanje korelacije visine titra antitela i intenziteta promena ali se prema novijim studijama većina autora slaže da klinički nalaz i visina titra vrlo često nisu u korelaciji; često se dešava da se nađe pozitivan IIF test kod pacijenata koji su u dugotrajnoj remisiji [151, 153, 154]. Takođe, kod 31-71% zdravih srodnika mogu se naći autoantitela, često i u visokom titru u odsustvu bilo kakvih kliničkih manifestacija bolesti [155-157].

1.5.4. Tzanckov test

Tzanck-ov test predstavlja bezbolnu dijagnostičku proceduru za rano i brzo otkrivanje akantolitičnih ćelija, otkrivaju se kod skoro svih obolelih [143]. Nalaz akantolitičnih ćelija (okrugle ćelije sa eozinofilnom citoplazmom, piknotičnim jedrom i perinukleranim haloom) u preparatu nije dovoljan za postavljanje dijagnoze autoimunskog pemfigusa. Tzanckov test može se koristiti i za DIF test [143].

Pored patognomoničnih akantolitičnih ćelija često se u preparatu mogu naći tzv. Sertolijeve rozete (*Sertoli's rosettes*) koje se sastoje od centralnog nekrotičnog keratinocita okruženog leukocitima [70, 143].

1.5.5. ELISA (eng. enzyme - linked immunosorbent assay)

ELISA je predstavlja kvantitativnu tehniku kojom se meri nivo antitela na Dsg1 i Dsg3 i koja je vrlo senzitivna i specifična za obolele od pemfigusa. Fenotipske karakteristike (klinička prezentacija) bolesti zavisi od profila antitela i ekspresije odnosno distribucije antigena [63, 154, 158].

I u serumu pacijenata sa PNP prisutna su antitela na Dsg 3 i 1 što govori u prilog njihovoj ulozi u patogenezi PNP. Može se smatrati da, kada je došlo do narušavanja arhitektonike

dezmozoma zbog antitela prema dezmozomalnim transmembranskim proteinima, antitela prema citoplazmatskim proteinima - plakinima ulaze u ćeliju i vezuju se za njih i dovode do promena karakterističnih za PNP kao što je masivna infiltracija epiderma limfocitima i nekroza keratinocita [142].

Studije koje su korelirale stepen aktivnosti bolesti i titar antitela na Dsg1 i Dsg3 pokazale su da titar antiDsg korelira sa stepenom aktivnosti bolesti i to titar antiDsg1 korelira sa izraženijim kutanim promenama a antiDsg3 sa promenama na sluzokožama [151, 154, 159-162]. Iako je ELISA senzitivna metoda u dijagnostici oboljenja iz grupe pemfigusa, postoje odstupanja. Treba imati na umu da se ELISA testom meri ukupni IgG vezan za ektodomen Dsg1 ili Dsg3. Kod pacijenata u aktivnoj fazi bolesti prisutna su IgG1 i IgG4 klase antitela. U slučajevima sa visokim titrom antiDsg antitela a sa minimalnim stepenom aktivnosti bolesti, moguće je da postoje druge podklase IgG u visokom titru ili pak da su antitela vezana za druge ektodomene dezmozogleina koji ne dovode do daljeg pogoršanja oboljenja [154]. U slučajevima kada je visok stepen aktivnosti sa niskim titrom antiDsg antitela, moguće je da postoje patogena antitela u serumu koja se ili ne vezuju za Dsg ili se vezuju za intracelularni deo Dsg, što sve nije moguće otkriti ELISA testom [154]. Zabeležena su i etničke varijacije u visini titra Dsg [160]. Takođe iako u većini slučajeva titar antiDsg3 korelira sa stepenom aktivnosti bolesti, to često nije slučaj sa antitelima na Dsg1. Razlog tome je možda varijabilna ekspresija Dsg 1 u inicijalnoj fazi bolesti dok je Dsg3 ekspresiran na mukozi i u koži manje više konstantan [63, 154]. Opet, u kliničkoj remisiji dolazi do značajnog pada titra i potom nestanka antiDsg1 antitela u serumu dok se titar antiDsg3 antitela može održavati u odsustvu bilo kakvih kliničkih manifestacija [162].

1.5.6. Ostala imunološka ispitivanja

Imunoblot (IB) i imunoprecipitacija se ne koriste u rutinskoj dijagnostici oboljenja iz grupe pemfigusa. Metode se koriste za određivanje ciljnih antigena, odnosno kompleksa tih molekula [163].

Kod IB, antigeni se elektroforezom razdvajaju na osnovu molekulske mase preko gela; razdvojeni proteini se potom elektroforetski transferišu na inertne membranske filtere, potom inkubiraju, ispiraju a zatim se vezuju za antitela u serumu obolelih [163]. IB tehnikom detektuju se antigeni za koja su specifična autoantitela u serumu obolelih. Svi serumi obolelih

od PV reaguju sa proteinom molekulske mase 130 kDa (Dsg3). Približno jedna trećina pacijenata sa PF reaguje sa proteinom molekulske mase 130 kDa (Dsg1) [163].

Imunoprecipitacijom kod obolelih od pemfigusa izdvaja se kompleks molekula od 230 kDa, 130 kDa i 85 kDa - Dsg3, plakoglobin (85 kDa) i njihov kompleks (210 kDa) [49, 164]. Određeni broj pacijenata sa PV precipitira i antigeni kompleks PF: 160 kDa (Dsg1), 85 kDa (plakoglobin) i njihov kompleks (260 kDa). Kod PV mogu postojati autoantitela prema dezmozolinu [165], dezmozoplakinu [166], kao i prema drugim antigenima najverovatnije zbog fenomena širenja epitopa [167].

Imunoprecipitacija je značajna u dijagnostici rezistentnih formi PV koje dovode u sumnju moguć PNP [168]. Imunoprecipitacijom se u serumu obolelih od PNP pored Dsg1 i Dsg3 izdvajaju: envoplakin (210 kDa) i periplakin (190 kDa), potom desmoplakin I i II (250 i 210 kDa). Ređe se vidjaju BPAG1 (bulozni pemfigoid antigen 1) (230 kDa), plektin i plakoglobin, kao i protein molekulske mase 170 kDa [49, 142, 167, 169-174]. BPAG 1 je važan protein hemidezmozoma. Budući da su plak proteini ključni u arhitektonici epiderma, interakcija autoantitela sa ovim proteinima dovodi do značajnih poremećaja, što se i klinički manifestuje kod PNP [123].

Antigeni kod PH su Dsg1 najčešće i ređe Dsg3 [49, 123]. Kod pacijenata sa PH takođe je dokazano da pod dejstvom autoantitela dolazi do sekrecije IL-8 [49]; za P Veg Dsg3 a postoje pojedinačni slučajevi autoantitela na Dsg1, Dsc i periplakin [128]. Različiti su rezultati kada je reč o target antigenima za IgA pemfigus. Kod određenog broja pacijenata sa IgA pemfigusom utvrđeno je prisustvo autoantitela koja prema Dsc i Dsg3 [123]. U nekoliko studija dokazano je prisustvo antitela koji prepoznaju proteine molekulske mase 115 i 105 kDa koji odgovaraju goveđem Dsc mada IB thenikom korišćenjem ekstrakta humanih keratinocita isto nije dokazano [142].

1.6. Step en aktivnosti bolesti

Još uvek ne postoji jedinstveni prihvaćeni metod ocenjivanja stepena aktivnosti bolesti.

Jedan od najranije korišćenih sistema za izračunavanje stepena aktivnosti bolesti je PAAS (*eng.* Pemphigus Area and Activity Score), koji u obzir uzima površinu zahvaćene kože i broj lezija, kako na koži tako i na sluzokožama. Baziran je na sistemu ocenjivanja stepena aktivnosti kod pacijenata sa psorijazom - PASI (*eng.* Psoriasis Activity and Severity Index)

[175-177]. U obzir uzima broj bula, periferno širenje bula, *Nikolsky* znak, površinu zahvaćene kože, kao i stepen zahvaćenosti mukoza. Skor se izračunava sabiranjem skora za kožu i za mukoze, maksimalni skor za kožu iznosi 15, za sluzokože 6 [175, 177].

ABSIS (*eng.* Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score) je razvijen 2007. godine, koristi se i za druge autoimunske bulozne dermatoze. ABSIS skor se bazira na dva klinička parametra: 1) zahvaćenost površine kože i 2) izgleda lezija (suve erozije, vlažne ili u epitelizaciji) [176, 178].

Drugi prihvaćeni sistem za ocenjivanje stepena aktivnosti bolesti je PDAI (Pemphigus Disease Activity Index) razvijen od strane IPDC (*eng.* International Pemphigus Definitions Committee). Ima 3 tačke ocenjivanja - mukoze, koža i kapilicijum (prilog 1) [176, 177]. PDAI skor obuhvata stepen aktivnosti koji se izračunava za 12 anatomskih lokalizacija i stepen oštećenja, tj prisustvo ili odsustvo rezidualne hiperpigmentacije. Totalni maksimalni skor je 263 (250 poena za aktivnost i 13 poena za oštećenje) [176, 177]. Rosenbach i autori su, upoređivanjem dva sistema ocenjivanja - ABSIS i PDAI, zaključili postojanje bolje korelacije PDAI sa aktivnošću bolesti odnosno bolju pouzdanost PDAI sistema u odnosu na ABSIS i bolju izvodljivost istog [176, 179].

Ostale manje korišćene metode za ocenjivanje stepena aktivnosti bolesti su PAS (*eng.* Pemphigus Activity Scor), Ikeda indeks, Harmanov skor, Mahjanov scoring sistem, Kumarov scoring sistem [176, 177].

1.7. Udruženost pemfigusa i drugih oboljenja

Pojava udruženosti oboljenja iz grupe pemfigusa sa drugim imunološkim oboljenjima javlja u oko 25% pacijenata [180]. Najčešće su opisivani slučajevi istovremenog postojanja pemfigusa i *myastheniae gravis* (MG) bez, ili češće, udružene sa timomom. U oko 40% pacijenata sa timomom dolazi do pojave MG i drugih autoimunskih bolesti [181]. Udruženost pemfigusa i MG doprinosi razvoju teorije o postojanju patogenih antitela koja nisu anti Dsg; antitela kod MG su usmerena na Ach receptore u postsinaptičkim neuromišićnim spojevima (nAChR) i na membrani keratinocita (nAChR i mAChR). Blokiranjem receptora na neuromišićnim spojevima dolazi do simptoma mijastenije, a receptora na membrani keratinocita do gubitka kohezije i akantolize [180].

Autoimunske bolesti štitne žlezde kod pacijenata sa pemfigusom više puta su zabeležene [180, 182-184]. Zabeleženo je postojanje pemfigusa i sistemskog lupusa, buloznog pemfigoida, reumatoidnog artritisa (zbog upotrebe tiolskih lekova u terapiji reumatoidnog artritisa, prvenstveno penicilamina). Pojedinačni slučajevi postojanja PV i psorijaze, vitiliga, alopecije, *Lichen planusa*, *Mb Darier* [181].

PNP je najčešće udružen sa malignitetom i to sa limfoproliferativnim oboljenjima u oko 84% slučajeva mada postoje slučajevi PNP uz benignu neoplaziju [181]. Postoje različite patogenetske mogućnosti kod udruženosti PNP i tumora: 1) sekrecija antitela od strane tumora (na pr. B ćelijski limfomi), 2) unakrsna reaktivnost antitela sekretovana od strane epitelijalnih tumora, kao što je najčešće spinocelularni karcinom, 3) smanjen imunološki nadzor protiv neoplazije uzrokovan terapijom pemfigusa (kortikosteroidi, imunosupresivi) i posledični razvoj neoplazije, 4) moguća uloga virusa u razvoju kako neoplazije tako i pemfigusa [180]. Najčešće opisivani su non-Hodgkin-ov limfom, hronična limfocitna leukemija, timom, Castelmanov tumor, retroperitonealni sarkom i *Waldenström*-ova makroglobulinemija, ređe karcinomi pankreasa, uterusu, bubrega i hepatocelularni karcinom [181]. PNP u dečjem uzrastu i u adolescenciji je najčešće udružen sa Castelmanovim tumorom i Hodgkin-ovim limfomom [181, 185].

1.8. Terapija Pemfigusa

Prirodni tok nelečenog pemfigusa se razlikuje zavisno od kliničke forme oboljenja ali je očekivani ishod skoro bez izuzetaka letalan. Uvođenjem kortikosteroida (KS) u terapiju pedesetih godina prošlog veka, a potom i imunosupresiva šezdesetih godina, mortalitet je smanjen sa 100% na 5-10% [2, 180, 186]. Na molekularnom nivou, glukokortikoidi aktiviraju svoje receptore u citoplazmi ćelija, formiraju komplekse koji migriraju u nukleuse ćelija gde reaguju sa regulatornim mestima na DNK, što doprinosi modulaciji (pozitivnoj ili negativnoj) ekspresije gena odgovornih za inflamatorni i imunski odgovor [186]. Glukokortikoidi uzrokuju apoptozu limfocita, utiču na migraciju polimorfonukleara, inhibiraju ekspresiju gena za nekoliko citokina, inhibiraju plazminogen aktivator [186]. Pulsne doze glukokortikoida ispoljavaju efekte na membrani limfocita interferirajući sa delovanjem jonskih kanala ili pak interferiraju direktno sa pojedinim signalnim putevima nezavisno od ekspresije gena.

S obzirom na potrebu korišćenja visokih doza KS a i imunosupresiva, brojni neželjeni efekti terapije su prisutni i stalno se traga za novim terapijskim modalitetima. Iako sada postoje

brojni terapijski protokoli, mali je broj randomiziranih studija, prednost određenih terapijskih modaliteta u odnosu na druge se ne može sa preciznošću odrediti [187-189]. Postoje brojne teškoće vezane za evaluaciju i poređenje različitih terapijskih pristupa zbog malog broja kontrolisanih studija, malih serija pacijenata, nemogućnosti da se definišu kriterijumi terapijskog odgovora, kao i zbog odloženih terapijskih dejstava imunosupresiva i neophodnosti da se kombinuju sa KS terapijom [2].

Ciljevi terapije su supresija imunskog odgovora i smanjenje produkcije antitela u cilju postizanja remisije [2]. Pacijenti su potom duže na terapiji održavanja (niske doze ili kortikosteoroida ili imunosupresiva/ ili imunomodulatora). Glavni cilj jeste potpuno isključenje lekova i da pacijent bude u dugotrajnoj kliničkoj remisiji bez ikakve terapije. Smatra se da se u oko 50% pacijenata sa pemfigusom nakon postizanja kliničke remisije terapija može u potpunosti obustaviti i postići remisija od minimum nekoliko meseci do više godina [2].

U literaturi je do danas objavljen veliki broj istraživanja kojima su autori pratili tok i prognozu pemfigusa uz različite terapijske modalitete; na osnovu dosadašnjih iskustava postulirano je da bez obzira na terapijski pristup oboljenjima iz grupe pemfigusa inicijalna faza lečenja zahteva davanje visokih doza KS. Visoke doze KS sprečavaju pojavu tzv. širenja epitopa [188]. Ne postoji konzesus vezan za inicijalnu dozu KS potrebnu da dovede do remisije; optimalne doze KS, vrsta KS i metoda primena (*per os*, *i.m.*, *i.v.*, pulsne doze) su i dalje empirijske. Visoke (pulsne) doze intravenskih KS, u kombinaciji ili bez pulsnihi doza imunosupresiva je u većini slučajeva doprinelo značajnom smanjenju neželjenih efekata KS i dužim remisijama [23, 162, 186, 190]. Pulsne doze KS takođe nisu standardizovane ali obično se koristi metliprednizolon 500-1000 mg (ili u ekvivalentu drugog raspoloživog KS) [186].

Od imunosupresiva u terapiji pemfigusa koriste se azatioprin, mikofenolat mofetil (MMF), ciklofosamid, metotreksat, hlorambucil; od imunomodulatora ciklosporin, intravenski imunoglobulini (IVIG), inhibitori TNF, rituximab. Od antiinflamatornih agenasa u upotrebi su tetraciklini, soli zlata, dapson [62]. Imunosupresive zbog ispoljavanja prvih terapijskih efekata nakon 4 i više nedelja ne treba koristiti kao monoterapiju u inicijalnoj fazi lečenja [2].

Azatioprin je najčešće korišćen imunosupresiv i uz KS terapiju smatra se lekom izbora u terapiji pemfigusa [2, 186, 191]. Rizik pojave neželjenih dejstava azatioprina - leukopenije, trombocitopenije, anemije i naročito hepatotoksični efekat je učestao. Potrebno je pacijentima

odrediti nivo tiopurin metil transferaze (TPMT) s obzirom da je 1 od 300 pacijenata homozigot za inaktivan TPMT alel i korišćenje leka kod tih osoba će dovesti do akutne mijelosupresije [186, 189, 191].

MMF je estar mikolefolne kiseline, hidrolizom se pretvara u aktivni metabolit mikofenolnu kiselinu koja inhibira inozin monofosfat dehidrogenazu i selektivno inhibira sintezu purina i pirimidina u T i B limfocitima dok su neželjeni efekti na ostalim ćelijama minimalni [187, 189, 191, 192]. Manje je hepatotoksičan od azatioprina i za razliku od ciklofosfamida nema nefrotoksična dejstva [189]. Koristi se u kombinaciji sa KS, značajno umanjuje rizik od recidiva po isključenju kortikosteroida. U novijoj randomiziranoj studiji Ioannides i autori nisu dokazali efikasnost MMF [2].

Ciklofosfamid, alkilirajući agens koji utiče na ćelijski rast i mitotsku aktivnost; konvertuje se u jetri u aktivni metabolit aldofosfamid koji se vezuje za DNK i inhibira replikaciju i inicira apoptozu [191]. Takođe se pokazao efikasnim u terapiji pemfigusa, bilo u pulsanim dozama (uglavnom u inicijalnoj fazi) ili peroralno, mada u nekoliko kontrolisanih ili randomiziranih studija nije dokazana efikasnost, a rizik razvoja neželjenih dejstava terapije bio je povećan [193]. Najčešći neželjeni efekti su hemoragični cistitis, azospermija i amenoreja odnosno rizik razvoja maligniteta nakon dugotrajne terapije [23, 191].

Metotreksat, inhibitor sinteze purina i pirimidina, dovodi do redukcije proliferacije T ćelija. Inicijalno je korišćen u terapiji pemfigusa ali zbog potrebe za višim dozama i samim tim izraženijim neželjenim efektima, ređe se koristi premda su kontroverzni podaci i o efikasnosti i o neželjenim efektima [186, 191, 192]. Ciklosporin je manje je efikasan od azatioprina, mikofenolat mofetila i ciklofosfamida [191, 193]. Pokazuje značajno manja hepatotoksična dejstva od drugih imunospupresiva i smatra se relativno sigurnim lekom u trudnoći [191]. Hlorambucil, alkilirajući agens, inhibira DNK sintezu alkiliranjem nukleinskih kiselina. Može biti efikasan naročito kod pacijenata koji razviju hemoragični cistitis [2, 192]. Upotreba hlorambucila smanjila je neželjene efekte na bešici nakon upotrebe ciklofosfamida ali posledični razvoj maligniteta doprinosi da se ovaj lek ne koristi često. Druga neželjena dejstva se azospermija, amenoreja i pneumonije, fibroza pluća [192].

Inhibitori TNF kao što su infiksimab, etanercept, adalimumab takođe su korišćeni sa zadovoljavajućim uspehom [86, 186, 191, 193-195]. El Darouti i saradnici su publikovali podatke o seriji pacijenata lečenih pentoksifilinom i sulfasalazinom (uz pulne doze

kortikosteroida i imunosupresiva) koji poseduju snažna inhibitorna dejstva na TNF sa zadovoljavajućim efektima [196].

Rituximab, monoklonalno (anti CD20) IgG1 antitelo, uzrokuje lizu CD20+ ćelija (zrelih B limfocita a ne deluje na stem ćelije i pro-B limfocite i plazma ćelije budući da ne ekspimiraju CD20 molekul na svojoj površini). Rituximab se koristi kod refraktornih formi pemfigusa kod kojih nije bilo odgovora da konvencionalnu terapiju [85, 190, 193]. Zabeležena neželjena dejstva kao što su pijelonefritis, neutropenija, septikemije i sepse, masivne pneumonije, oportunističke infekcije, javljaju se u različitoj učestalosti u zavisnosti od ispitivane serije [183, 189, 192, 195].

Invtravenski imunoglobulini (IVIG) se koriste za lečenje refraktornih formi pemfigusa, u kombinaciji sa visokim dozama kortikosteroida u inicijalnoj fazi uz adjuvantni imunosupresiv ili ne [191, 192]. IVIG smanjuju titar autoantitela, moduliraju funkcije B limfocita, inhibiraju produkciju komplementa i citokina; pokazuju minimalna neželjena dejstva. Smatra se relativno sigurnim lekom u trudnoći [191, 197].

I plazmafereza i imunoabsorpcija (IA) spadaju u alternativne terapijske procedure kod refraktornih formi pemfigusa. S obzirom da se filtriraju i odstranjuju autoantitela zbog povratnih mehanizama i mogućnosti sekrecije novih antitela, plazmaferezu je potrebno kombinovati sa visokim dozama kortikosteroida i imunosupresiva s obzirom da sve ove terapije deluju na B ćelije [180, 193, 198]. Pokazano je da su infekcije kao komplikacije terapije bile učestalije kod pacijenata lečenih plazmaferezom uz kortikosteroide, nego kod onih lečenih samo kortikosteroidima [186, 191]. IA je selektivnija metoda, sa manje neželjenih efekata od plazmafereze, do sada se zabeleženo 50ak slučajeva pemfigusa uspešno lečenih IA u kombinaciji sa imunosupresivnom i kortikosteroidnom terapijom [189, 191].

Upotreba dapsona pokazala je zadovoljavajući terapijski uspeh; smatra se terapijom izbora za PH kao i za IgA pemfigus [192, 193, 199, 200]. Upotreba soli zlata u terapiji pemfigusa je, zbog potencijalnih akantolitičnih svojstava lekova i čestih neželjenih reakcija (alergijske reakcije, nefrotoksičnost, mijelosupresija) retka [180, 193]. Tetraciklini sa ili bez nikotinamida korišćeni su kao adjuvantna terapija u pojedinačnim slučajevima sa varijabilnim terapijskim odgovorom [193].

Holinergički agonisti - piridostigmin bromid, nikotinamid (niacinamid), pilokarpin inhibiraju acetil holin esterazu, reaguju sa holinergičkim receptorima na membrani keratinocita i kod

malog broja pacijenata sa refraktornim pemfigusom gde su korišćeni, zabeleženi su zadovoljavajući terapijski odgovori [79, 82, 86, 193, 195]. U više studija zabeležen je pozitivan uticaj duvana kod pacijenata sa pemfigusom; nikotin koji je nikotinergički agens, stimuliše epitelizaciju [62, 82, 86, 92, 116].

U različitim fazama kliničkih ispitivanja su i različiti sintetički Dsg peptidi (PI-0824), ordinirani intravenski, 1 x nedeljno [195] ili aplikovani topikalno kao 0,1% krem [85] u oba slučaja sa zadovoljavajućim terapijskim dejstvom. Za sada nisu zabeležena značajnija neželjena dejstva ali nije bilo ni značajnih promena titra antiDsg [195] Inhibitori p38 MAK (KC 706) su do sada pokazali veliki broj neželjenih dejstava i za sada je obustavljena dalja upotreba [62].

2. CILJEVI RADA

U Srbiji do sada nisu sprovedena istraživanja polimorfizma HLA-DR i HLA-DQ alela kod pacijenata sa pemfigusom. Predloženo istraživanje bi po prvi put trebalo da pokaže distribuciju genskih alela koji kodiraju HLA molekule II klase kod naših pacijenata.

Imajući u vidu etničke razlike u dosadašnjim objavljenim istraživanjima važno je da se definišu genetičke specifičnosti naše populacije u odnosu na distribuciju alela koji kodiraju HLA molekule II klase kao i da se utvrdi korelacija haplotipova, fenotipskih karakteristika i antigenih profila kod naših pacijenata.

Postavljeni ciljevi rada su:

1. Ustanoviti učestalost očekivanih alela i haplotipova u HLA-DR i HLA-DQ lokusima.
2. Uporediti učestalost haplotipova ispitanika i zdrave populacije Srbije
3. Ustanoviti stepen sličnosti sa drugim populacijama (obolelima od *pemphigus vulgaris* - različite etničke grupe i na drugim geografskim lokacijama).
4. Ispitati da li postoji korelacija između genotipova, kliničkog toka bolesti i titrova antiDsg3 i Dsg1 antitela.

3. MATERIЈAL I METODE

Sprovedena je studija preseka u kojoj su obuhvaćeni svi uzastopni pacijenti sa *pemphigus vulgarisom* Klinike za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 2012-2013. godine. Novooboleli pacijenti, pacijenti prethodno lečeni kod kojih je došlo do recidiva kao i određeni broj pacijenata u kliničkoj remisiji.

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.1. Selekcija ispitanika

Definisani kriterijumi za uzimanje uzorka krvi podrazumevali su da pacijenti budu stariji od 18 godina, da je postavljena dijagnoza *pemphigus vulgarisa* i da su potpisali dobrovoljni pristanak za učešće u ispitivanju. Sakupljeni su uzorci od 72 konsektivna pacijenta obolela od *pemphigus vulgarisa* lečenih na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije.

Uslov za isključivanje iz istraživanja bila je želja ispitanika da ne učestvuje u istraživanju.

3.1.1. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela na podtipove pemfigusa

Dijagnoza pemfigus vulgarisa postavljena je na osnovu kliničke prezentacije, direktne i indirektne imunofluorescencije, i kod mukokutanih formi na osnovu i histopatološke verifikacije. Pacijenti su podeljeni u 2 grupe: grupa I- pacijenti sa promenama samo na sluzokožama (*pemphigus mucosae*) i grupa II- pacijenti sa promenama na koži i sluzokožama (mukokutani *pemphigus vulgaris*).

3.1.2. Procena aktivnosti bolesti kod pacijenata sa Pemphigus vulgarisom

Procena aktivnosti bolesti određivana je prihvaćenim sistemima ocenjivanja - PDAI skorom i PAAS skorom, prilozi 1 i 2 [176].

3.1.3. Zdrave kontrole

Kontrolnu grupu činile su osobe uzrasta iznad 18 godina, prijavljene u Registar davalaca kostne srži Srbije, čija je krv uzimana u Institutu za transfuziju krvi Srbije i koji nisu oboleli od pemfigusa, drugih autoimunskih buloznih bolesti.

Prvobitno je planirano da kontrolnu grupu čini 200 osoba. S obzirom da je u Registru prijavljeno 1992 davalaca kostne srži, za ispitivanje polimorfizama alelskih grupa HLA- DR lokusa korišćena je kontrolna grupa od njih 1992. Za ispitivanje polimorfizma HLA-DR i DQ lokusa korišćena je podgrupa od njih 159, a za ispitivanje učestalosti haplotipova podgrupa od 112 davalaca kostne srži.

Sve osobe prijavljene u Registar davalaca kostne srži od koji je uzimana krv i lični podaci, potpisale su pristanak.

3.2. Uzimanje uzoraka krvi od ispitanika

Uzorci krvi za analizu genskih polimorfizama pacijenata sa pemfigus vulgarisom uzimani su venepunkcijom na Klinici za dermatovenerologiju KCS dok su uzorci krvi od zdravih ispitanika uzimani u Institutu za transfuziju krvi Srbije. Od svakog ispitanika uzet je uzorak pune krvi (3 ml) u epruvetu sa EDTA kao antikoagulansom. Uzorci krvi su čuvani na -20°C i potom transportovani do laboratorije gde su dalje obrađivani, i gde je izolovana, čuvana i dalje analizirana genomska DNK.

3.2.1. Izolacija DNK

Kod ispitanika, izolacija DNK i potom HLA tipizacija vršena je u specijalizovanoj laboratoriji u Heidelbergu (Synlab).

Genomska DNK je izolovana iz 200 μl pune krvi ispitanika upotrebom QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN, Germany) prema protokolu proizvođača.

Ukratko, puna EDTA krv u vacutainer epruvetama je promešana okretanjem epruvete gore-dole nakon čega je iz svake uzimano po 200 μl krvi. Nakon dodavanja 20 μl QIAGEN proteaze u tubicu od 1,5 ml, dodvano je 200 μl uzorka i 200 μl AL pufera za liziranje. Nakon inkubacije tokom 10 minuta na 56°C , dodavano je 200 μL 96% etanola. Smeša je vorteksirana 15s i inkubirana 10 minuta na 56°C . Zatim je dodavano 200 μl 96% etanola, nanošeno u QIAamp Mini spin kolonu i centrifugirano 1 minut na 8000 obrtaja. Kolone su zatim prebacivane u čiste kolekcione epruvete i ispirane sa dva različita pufera u cilju dobijanja čiste DNK koja je eluirana sa 200 μl AE pufera. Ovim postupkom se iz 200 μl pune krvi je dobijano oko 6 μg DNK. Izolovana DNK je zamrznuta na -20°C do daljeg postupka.

Koncentracija i čistoća DNK ($\mu\text{g/ml}$) u svakom uzorku je određivana spektrofotometrijski. Preporučeni indeks čistoće DNK je bio između 1,5 i 2 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$).

3.2.2. HLA tipizacija

HLA tipizacija je vršena molekularnim testovima koji su zasnovani na reakciji lančanog umnožavanja DNK (PCR). Određivanje grupe alela ispitivanog lokusa je vršeno testovima niske/srednje rezolucije. Zatim su testovima visoke rezolucije određivani aleli ispitivanog lokusa. Korišćene su dve vrste testova.

Prva grupa testova je korišćena je za određivanje grupe alela upotrebom oligonukleotidnih proba specifičnih za sekvencu (PCR-SSO).

Druga grupa testova korišćena je za dokazivanje alela, kao i za razrešavanje nejasnih-dvosmislenih rezultata (*ambiguity*) dobijenih tehnikom PCR-SSO (na pr. HLA-DRB1*14 alel) upotrebom prajmera specifičnih za sekvencu (PCR-SSP).

HLA tipizacija vršena je prema preporukama proizvođača testova (BAG lich Germany i Invitrogen).

3.2.3. Određivanje alelske grupe - niska rezolucija

Korišćeni su komercijalni kitovi (HISTO TYPE SSP Kits, BAG lich, Germany).

Sve već razlivenne reakcione smeše sadrže liofilizovane prajmere specifične za alele i interne kontrole u reakcionim posudicama, PCR Master Mix i informacione tabele specifične za lot. Parametri amplifikacije su optimizovani za konačnu zapreminu od $10 \mu\text{l}$. Prvo je pravljeno Master-Mix koji se sastoji od sadrži od $1 \mu\text{l}$ $10 \times$ PCR-pufera, $0,08 \mu\text{l}$ Taq polimeraze ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$) i $7 \mu\text{l}$ destilovane vode.

U svaku reakcionu tubicu je sipano $8 \mu\text{l}$ rastvora i dodavano $2 \mu\text{l}$ prethodno izolovane DNK. Smeša se potom dobro promeša - vorteksira. Nakon vorteksovanja po $10 \mu\text{l}$ ove smeše je dodavano u unapred razlivenne i osušene reakcione smeše. Tubice su potom postavljane u programabilni termoblok i startovan je PCR program. Parametri temperaturnog ciklusa prema uputstvu proizvođača prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3: Parametri amplifikacije

Programski korak	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
Prva denaturacija	96°C	5 min	1 ciklus
Denaturacija	96°C	20 sec	5 ciklusa
Hibridizacija + ekstenzija	68°C	1 min	
Denaturacija	96°C	20 sec	10 ciklusa
Hibridizacija prajmera	64°C	50 sec	
Ekstenzija	72°C	45 sec	
Denaturacija	96°C	20 sec	15 ciklusa
Hibridizacija prajmera	61°C	50 sec	
Ekstenzija	72°C	45 sec	
Finalna Ekstenzija	72°C	5 min	1 ciklus

3.2.4. HLA visoka rezolucija

Razdvajanje produkata amplifikacije vršilo se gel elektroforezom na (horizontalnom) agaroznom gelu. Kao pufer za elektroforezu korišćen je 0.5 x TBE pufer (45 mM tris, 45 mM borna kiselina, 0,5 mM EDTA). Koncentracija agaroze u gelu bila je 2%.

Nakon završetka amplifikacije, nanošena je kompletna reakciona smeša u svaku rupicu u gelu. Dodatno je nanosi 10 µl standarda DNK da bi bilo moguće određivanje veličine amplifikovanih fragmenata. Elektroforeza se vršila u pomoću jednosmerne struje napona 200V), tokom 20 - 40 minuta. Nakon razdvajanje završeno, gel je bojen 30 - 40 minuta u rastvoru etidijum bromida (EtBr) (približno 0,5 µg/ml EtBr u H₂O). Vizualizacija PCR produkata vršena je pomoću UV transiluminatora (254 nm), i dokumentovana video sistemom.

Prilikom interpretacije koristi se tabela specifičnosti i dijagram za evaluaciju pomoću softvera HISTO MATCH (BAG Health Care) ili SCORE (DRB1* i DQB1*) odnosno UniMatch Software 4.0 (Invitrogen Corp., Madison, Wi, USA) (DQA1*).

Aleli na DQA lokusima određivani su testovima visoke rezolucije upotrebom AllSet AllSet+™ Gold SSP Typing Kits (Invitrogen Corp., Madison, Wi, USA). Parametri temperaturnog ciklusa prema uputstvu proizvođača prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4: Parametri amplifikacije

Programski korak	temperatura	Vreme (sec)	Broj ciklusa
Prva Denaturacija	96°C	60	1 ciklus
Denaturacija	96°C	25	5 ciklusa
Hibridizacija	70°C	50	
Ekstenzija	72°C	45	
Denaturacija	96°C	25	21 ciklus
Hibridizacija	65°C	50	
Ekstenzija	72°C	45	
Denaturacija	96°C	25	4 ciklusa
Hibridizacija	55°C	60	
Ekstenzija	72°C	120	

3.3. ELISA

Za utvrđivanje koncentracije Dsg1 i 3 korišćen je Euroimmun Anti-Desmoglein 1 i Anti-Desmoglein 3 ELISA (IgG) prema uputstvu proizvođača (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Nemačka). Iz krvi je centrifugiranjem izolovan serum u čiste epruvete. Serum je potom promešan kratko vorteksiranjem nakon čega je iz svake uzimano po 100 µl seruma i pipetirano u pojedinačne komore mikroploče (mikrotitarske ploče) u čijim se zidovima nalazi antigen (jedna mikroploča sadrži Dsg1, druga ploča Dsg3) a nakon toga i po 100 µl kalibratora, pozitivnih i negativnih kontrola. Uzorci, kalibratori i kontrole su potom inkubirani na sobnoj temperaturi 30 minuta a potom je u njih dodavano po 300 µl Wash Buffera, tri puta uzastopno po 30-60 sekundi. Posle svakog dodavanja, energično je odlivan višak tečnosti. Potom je dodavano 100 µl konjugata (peroksidaza - obeleženi anti imunoglobulin G) po komorici i uzorci su ponovo inkubirani na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon inkubacije mikroploča je ponovo ispirana sa 300 µl Wash Buffera po komorici, tri puta uzastopno po 30-60 sekundi i višak tečnosti je energično odlivan. Zatim je dodavano 100 µl supstrata po komorici i u zatamnjenoj prostoriji mikroploče su inkubirane na

sobnoj temperaturi 15 minuta. U posljednjem koraku, dodavano je 100 µl rastvora za zaustavljanje enzimske reakcije po komorici. Rezultati su potom očitani spektrofotometrijski. Rezultati su tumačeni na osnovu odnosa linearne krive kalibratora i koncentracije antitela u serumu pacijenata. Za serume čije su koncentracije antitela bile iznad vrednosti kalibratora 1 (200 RU/ml) ponovljen je gore navedeni postupak sa razblaženjem 1:400 i potom su dobijene vrednosti množene sa 4. Prema preporukama proizvođača, vrednosti ispod 20 RU/ml smatrale su se negativnim, preko 20 RU/ml pozitivnim.

3.4. Dijagnostičke procedure

3.4.1. Direktni imunofluorescentni test

Kod svih pacijenata rađen je direktni imunofluorescentni test. Uzimana je perileziona koža (neizmenjena koža neposredno uz leziju). Uzorci tkiva za DIF test su trenutno zamrzavani u tečnom azotu, potom su se smrznuti uzorci tkiva kalupili u tečnosti za kalupljenje, nakon čega su sečeni na kriostatu na isečke debljine 4-6 µm. Na kraju su se uzorci skidali sa kriotoma, lepili na staklene pločice i sušili na vazduhu 15 minuta. Nakon sušenja na vazduhu uzorci su ispirani u PBS-u (*eng.* phosphate buffered saline) dva puta po 10 minuta. Pločice sa isečcima tkiva su potom inkubirane u vlažnoj komori sa primarnim antihumanim FITC (fluorescein izotiocijanat) konjugovanim antiserumima 20-30 minuta na sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije, ispirane su u PBS-u 30 minuta (tri puta po 10 min). Na kraju su pločice pokrивane pokrovnim ljupticama pomoću puferisanog glicerina (90% glicerina u PBS-u) i posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom.

Kod svih pacijenata sa pemfigusom uključenih u studiju dokazano je prisustvo intercelularnih retikularnih fluorescirajućih depozita IgG u epidermu, čitavom širinom epiderma.

3.4.2. Histopatološki nalaz

Uzimana je elipsasta biopsija lezije (intaktna bula). Kod pemfigusa samo sa mukoznim promenama uziman je samo direktni imunofluorescentni test. Nakon uzimanja biopsije, uzorci su fiksirani u 4% puferisanom rastvoru formalina, potom su kalupljeni u parafin, sečeni standardnim mikrotomom na preseke debljine 3-5 mikrometara i nakon toga bojani hematoksilin-eozinom.

3.4.3. Indirektni imunofluorescentni test

Uzorci krvi (3-5 ml) pacijenta bez antikoagulansa su centrifugirani kako bi se odvojio serum od koagulisane krvi. Zatim su pravljena serijska razblaženja seruma (1:10, 1:20, 1:40, itd.). Na Klinici za dermatovenerologiju KCS kao tkivni supstrat korišćen je ezofagus majmuna. Vršena je inkubacija sa serumom pacijenta u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije vršeno je ispiranje u PBS-u tri puta po 10 min. Tkivni preseki su inkubirani sa FITC konjugovanim anti-IgG, anti-IgA na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Nakon ispiranja u PBS-u (10min.) i sušenja na vazduhu tkivni supstrati su prekrivani pokrovnim ljusticama uz pomoć puferisanog glicerola i posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom.

3.5. Obrada podataka

3.5.1. Statistička obrada podataka

Distribucije frekvencija alela i genotipova određivane su kod pacijenata sa pemfigusom i zdravih osoba (kontrolna grupa). Preliminarna statistička analiza uključivala je primenu χ^2 testa za procenu značajnosti razlike u frekvenciji obeležja i Fišerov test tačne verovatnoće.

U svim testovima vrednosti verovatnoće, p-vrednosti manje od 0,05 smatrale su se značajnima, a manje od 0,01 visoko značajnim.

3.5.2. Testiranje Hardy-Weinberg ravnoteže

Učestalost alela i grupa alela dobijena je direktnim brojanjem. Ocena učestalosti pojedinačnih haplotipova dobijena je kroz postupak maksimizacije očekivanja (EM), odnosno maksimizacijom ocene verodostojnosti (MLE) mogućih kombinacija alela za date lokuse. Za dobijanje učestalosti alela i haplotipova korišćen je program ARLEQUIN, verzija 3.11 [201].

Hardy-Weinberg ravnoteža je ispitivana posebno za slučajeve i kontrole. Statistička analiza sastojala se iz primene χ^2 testa za procenu značajnosti razlike u frekvenciji dobijenih genotipova između ispitivanih bolesnika i zdrave, kontrolne grupe. Efekti genetskog polimorfizma, i rizika za oboljevanje od pemfigus vulgarisa su procenjivani logističkom regresionom analizom pri čemu je kao mera efekta korišćen OŠ (odnos šansi) sa intervalom poverenja od 95% (95% IP) za svaki ispitivani polimorfizam.

U svim testovima vrednosti verovatnoće, p-vrednosti manje od 0,05 smatrale se značajnima, a manje od 0,01 visoko značajnim.

3.5.3. Ostale statističke metode

Ostala statistička metodologija obuhvatala je deskriptivne i analitičke statističke metode

Od deskriptivnih, korišćeni su:

- apsolutni i relativni brojevi (n,%)
- mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana)
- mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije, interkvartilni raspon)

Od analitičkih statističkih metoda korišćeni su testovi razlike i analiza povezanosti.

Testovi razlike korišćeni u ovoj studiji su:

- parametarski (ANOVA, t test)
- nemaparametarski (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test, Hi-kvadrat test).

Za testiranje razlike između pojedinih grupa korišćena su naknadna testiranja sa Bonferroni korekcijom.

Za ispitivanje povezanosti korišćena je Spearman-ova i Pearson-ova korelaciona analiza.

Za ispitivanje slaganja korišćena je Kappa koeficijent.

Svi rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

4. REZULTATI

4.1. Epidemiološki podaci

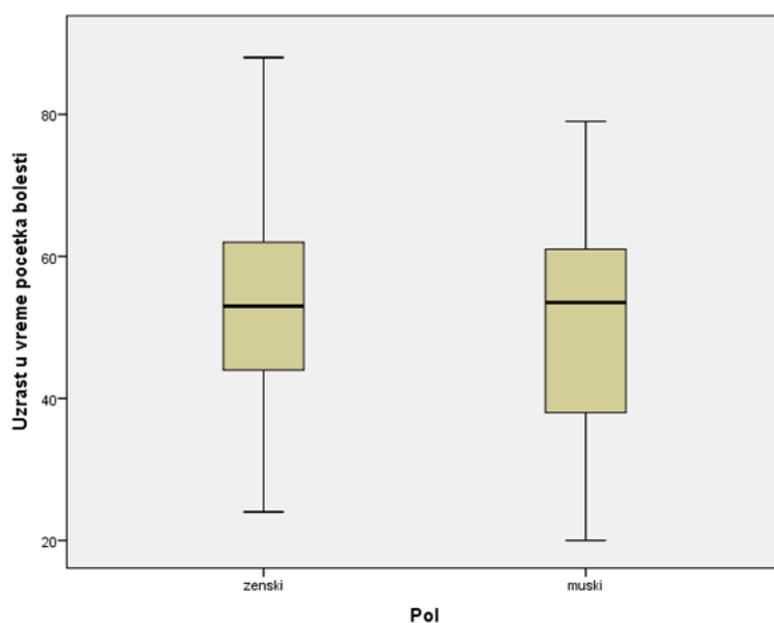
U studiju su uključeni pacijenti sa potvrđenom dijagnozom *pemphigus vulgaris* (PV). Ukupno je ispitivano 72 pacijenata sa PV. Zastupljenost pojedinih oblika PV bila je sledeća: pemfigus mukoza (PM) kod 8 (11,1%), mukokutani pemfigus (MCP) kod 64 (88,9%) pacijenata. Od ukupnog broja pacijenata, 46 (63,9%) je bilo ženskog i 26 (36,1%) muškog pola. Pacijenata srpske etničke pripadnosti bilo je 57 (79,2%), romske 10 (13,2%), poreklom iz Crne Gore 3 (4,2%) i po 1 pacijentkinja (1,4%) mađarske i rumunske etničke pripadnosti, obe rođene u Srbiji.

Od 10 pacijenata romske etničke pripadnosti bilo je 3 (30%) žene i 7 (70%) muškaraca; od 57 pacijenata srpske etničke pripadnosti bilo je 39 (68,4%) žena i 18 (31,6%) muškaraca; od 3 pacijenta porekolom iz Crne Gore, 2 su bile žene i 1 muškarac.

Starost pacijenata u vreme početka bolesti iznosila je od 20-88 godina, u proseku 53,5 godina.

Kod pacijenata romske etničke pripadnosti, prosečna starost oboljevanja iznosila je 39,5 godina a kod pacijenata srpske etničke pripadnosti 58. Nešto niži uzrast oboljevanja zabeležen je kod muškaraca (51,2 godine) u odnosu na žene (54,9 godina) (grafikon 1). Prosečna starost oboljevanja kod oba podtipa pemfigusa bila je slična: 53,9 PM i 53,5 godina MCP.

Grafikon 1: Uzrast oboljevanja prema polu



4.2. Kliničke karakteristike pacijenata

4.2.1. Zahvaćenost sluzokoža

Lezije na oralnoj sluzokoži postojale su kod svih pacijenata. Druge vidljive sluzokože po učestalosti bile su genitalna kod 20/72 (27,8%), nazalna kod 10/72 (13,9%) i konjunktivalna kod 8/72 (11,8%). Najveći broj pacijenata sa MCP njih 40/64 (57,8%) je bio sa jednom zahvaćenom sluzokožom, 27/64 (35,9%) sa dve, 4/64 pacijenta (4,7%) sa tri i 1/64 pacijent (1,6%) sa četiri, dok je u grupi PM najveći broj 4/8 pacijenta (50%) bilo sa dve zahvaćene sluzokože, 3/8 pacijenta (37,5%) sa jednom i 1/8 pacijent (12,5%) sa tri zahvaćene sluzokože.

Učestalost broja zahvaćenih sluzokoža u odnosu na etničku pripadnost prikazana je u tabeli 5.

Tabela 5: Zahvaćenost sluzokoža kod različitih etničkih pripadnosti

Etnička pripadnost	Broj zahvaćenih sluzokoža, n (%)				Ukupno
	1	2	3	4	
Srpska	34 (59,6)	20 (35,1)	3 (5,3)	0 (0,0)	57 (100,0)
Romska	4 (40,0)	4 (40,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	10 (100,0)
Ostali	2 (40,0)	3 (60,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (100,0)
Ukupno	40	27	4	1	72 (100,0)

n, broj pacijenata

Značajne razlike u broju zahvaćenih sluzokoža nisu zabeležene u odnosu na podtip pemfigusa, etničku pripadnost ili pol.

4.2.2. Stadijum bolesti

Pacijenti sa PV uključeni u studiju bili su u različitim fazama oboljenja; prema predloženom konsenzusu [202] klasifikovani su u 4 grupe (tabela 6).

Tabela 6: Stadijum oboljenja pacijenata u vreme testiranja

Pacijenti	Broj pacijenata (N=72)	Procenat (%)
Novooboleli	40	55,6
Recidiv	12	16,7
Kompletna remisija, na terapiji	13	18,0
Kompletna remisija, bez terapije	7	9,7
Ukupno	72	100,0

Od 40 novoobolelih pacijenata, 36 je imalo MCP, 4 PM. Od pacijenata u recidivu, 10 su imali MCP, 2 PM. U remisiji, na terapiji bilo je 12 pacijenata sa MCP i 1 sa PM, a u remisiji bez terapije 6 pacijenata sa MCP i 1 sa PM.

Dužina trajanja bolesti u vreme ispitivanja iznosila je od 4-192 meseca, u proseku 32,2 meseca za žene i 18 meseci za muškarce. U odnosu na podtip pemfigusa, prosečna dužina trajanja bolesti za MCP iznosila je 30,9, za PM 31,9 meseci. Kod prethodno lečenih pacijenata, vreme postizanja kliničke remisije (potpuno odsustvo kutanih i mukokutanih promena) iznosilo je od 7-30 meseci, u proseku $11,7 \pm 5,25$. Prosečna dužina remisije kod pacijenata sa PM iznosila je $6,4 \pm 7,13$ meseci, a kod MCP $14,3 \pm 31,05$ meseci.

4.2.3. Stepen aktivnosti bolesti

Aktivnost bolesti određivana je PDAI skorom. Vrednosti su se kretale od 0 (pacijenti u potpunoj remisiji) do maksimalne 83; prosečni PDAI iznosio je 32,5.

Vrednosti PDAI skora za podtipove pemfigusa prikazane su u tabeli 7.

Tabela 7: Prosečne vrednosti PDAI skora

Skor	Podtip PV	N	Prosečna vrednost	SD	Med	Minimum	Maksimum
PDAI	PM	8	13	10,46	10	0	29
PDAI	MCP	64	35,8	24,32	38	0	83

MCP, mukokutani pemfigus; PM, pemfigus mukoza; N, broj pacijenata; SD, standardna devijacija; Med, median

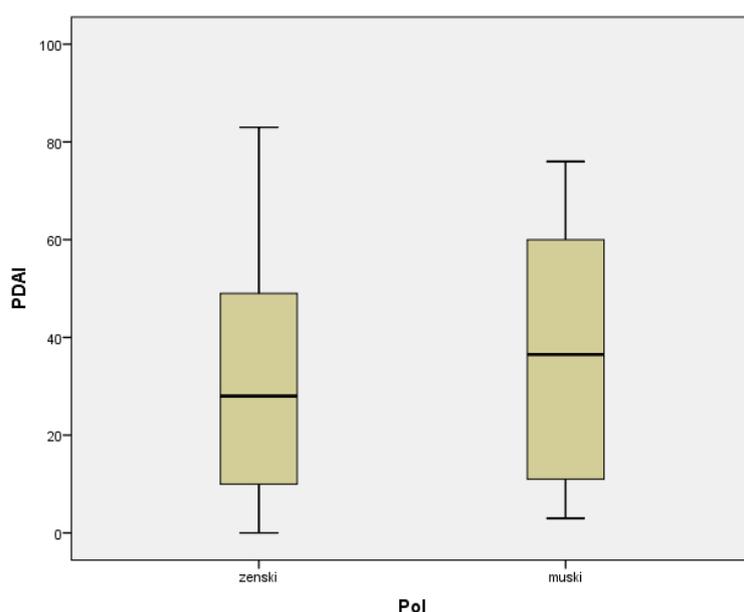
Prosečne vrednosti PDAI skora kod pacijenata različite etničke pripadnosti prikazane su u tabeli 8. Kruskal Wallis-ovom neparametarskom analizom dokazana je statistički značajna razlika ($p=0,03$) između PDAI kod različitih etničkih pripadnosti. Naknadnim testiranjem između svake grupe posebno (Man Whitney) određivano je koje su razlike značajne. Kod pacijenata srpske etničke pripadnosti prosečne vrednosti PDAI skora bile su niže i postojala je statistički značajna razlika sa PDAI ($p=0,04$) kod Roma. Takođe, statistički značajna razlika PDAI ($p=0,035$) postojala je između pacijenata srpske i ostalih etničkih pripadnosti iako je uzorak bio mali ($n=5$). Između pacijenata romske i drugih etničkih pripadnosti (osim srpske), nije bilo značajnih razlika u vrednosti PDAI skora ($p=0,976$).

Tabela 8: Vrednosti PDAI skora kod pacijenata različite etničke pripadnosti

Skor	Nacionalnost	N	Prosečna vrednost	SD	Med	Minimum	Maksimum
PDAI	srpska	57	28,1	22,93	23,0	0	76
	romska	10	52,6	17,53	54,0	29	76
	ostali	5	54,2	22,87	51,0	27	83
	Ukupno	72	33,3	24,25	32,5	0	83

N, broj pacijenata; SD, standardna devijacija; Med, median

Između muškaraca i žena nije bilo statistički značajnih razlika u stepenu aktivnosti bolesti izraženog PDAI skorom (grafikon 2).

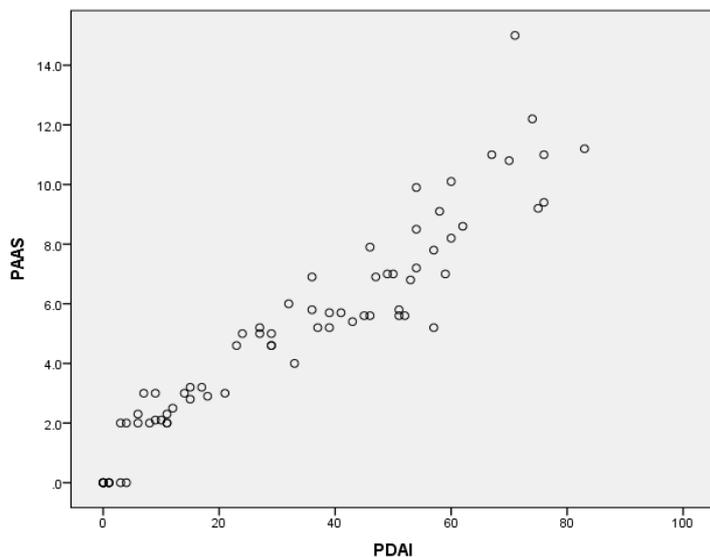
Grafikon 2: Stepen aktivnosti bolesti (PDAI) prema polu

U odnosu na stadijume bolesti, značajna razlika stepena aktivnosti bolesti zabeležena je između A) pacijenata u recidivu i pacijenata u kompletnoj remisiji, bez terapije ($p=0,02$) i na terapiji ($p=0,01$); između B) novoobolelih i pacijenata u remisiji, na terapiji ($p<0,01$) i bez terapije ($p<0,01$). Nakon Bonferroni korekcije (korigovana p vrednost), statistički značajna razlika postojala je između pacijenata u recidivu i pacijenata u remisiji bez terapije ($p_{adj}=0,013$), kao i između pacijenata u remisiji (sa i bez terapije) i novoobolelih ($p_{adj}<0,01$).

Kod testiranih pacijenata, stepen aktivnosti bolesti određen je i PAAS skorom. Postojala je jasna korelacija pozitivnog smera između vrednosti PDAI i PAAS, odnosno visok stepen uzajamne povezanosti ($Rho=0,963$; $p<0,001$) što govori u prilog da je i PAAS skor kao marker stepena aktivnosti bolesti takođe bio validan kod ispitanika (grafikon 3).

Za statističku analizu u ovom istraživanju korišćen je prihvaćeni sistem ocenjivanja stepena aktivnosti bolesti - PDAI.

Grafikon 3: Korelacija PDAI i PAAS



4.2.4. Komorbiditet i familijarni pemfigus

S obzirom na uzrastnu grupu pojave pemfigusa, komorbiditet je postojao kod 51 (70,8%) pacijenta, dok ostali nisu imali pridružene bolesti. Najčešće zabeleženi komorbiditeti bili su arterijska hipertenzija kod 42 (58,3%) pacijenata, druge bolesti srca kod 13 (18,1%). Postojanje drugih autoimunskih oboljenja kao što je *Diabetes mellitus* postojao je kod 6 (8,3%). Ostale inflamatorne bolesti kao što su psorijaza i bolest štitne žlezde postojale su kod jednog (1,4%) odnosno 2 (2,8%) pacijenta. Ostale zabeležene udružene bolesti bile su ulkusna bolest želuca kod tri (4,2%) i hronični gastritis kod tri (4,2%), obstruktivna bolest pluća kod tri (4,2%). Kod dva (2,8%) pacijenta postojao je anamnestički podatak o operativnom lečenju (prostata i jetra) u periodu dužem od 3, odnosno 4 godine pre ulaska u studiju.

Postojanje autoimunskog pemfigusa u familiji postojao je kod 4 (5,6%) pacijenata i to kod jednog pacijenta u srodnika I stepena, kod ostala tri među srodnicima II stepena. Kod ostalih 68 (94,4%) pacijenata nije zabeleženo postojanje pemfigusa u familiji.

4.2.5. Terapijski pristup

Pacijenti su tokom bolesti lečeni različitim terapijskim modalitetima u zavisnosti od težine kliničke slike i terapijskog odgovora. Najveći broj pacijenata, njih 39 (54,2%) je lečeno

jednim terapijskim modalitetom - najčešće pulsnom kortikosteroidnom terapijom bilo uz azatioprin ili ciklofosamid. Kod ostalih, bilo je potrebno sprovesti dva ili više terapijska modaliteta. Kod jednog pacijenta sa MCP sprovedena su četiri terapijska modaliteta u cilju stabilizacije oboljenja (pulsne doze deksametazona i ciklofosamida (DCP), pulsna kortikosteroidna terapija i azatioprin, konvencionalna KS terapija i azatioprin i plazmafereza). Terapijski modaliteti i broj modaliteta prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9: Terapijski modaliteti kod pacijenata sa pemfigusom

Terapijski modalitet	Broj terapijskih modaliteta			
	1	2	3	4
DCP*	9	8	6	1
DCP i Imuran	0	1	0	0
Klasična KS* i Imuran	20	23	6	1
Pulsna KS i Imuran	7	11	5	1
Samo KS	2	6	0	0
Plazmafereza	0	0	0	1
Klasična KS i Endoksan	1	0	1	0
Samo pulsna KS	0	1	0	0
IVIG*	0	1	0	0
Samo Imuran	0	1	0	0

*DCP, deksametazon ciklofosamidni puls; KS, kortikosteroidi; IVIG, intravenski imunoglobulini

U odnosu na podtip pemfigusa, terapijski modaliteti prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10: Terapijski modaliteti kod podtipova pemfigus vulgarisa

Podtip pemfigusa	Broj terapijskih modaliteta			
	1	2	3	4
MCP	34	24	5	1
%	53,1	37,5	7,8	1,6
PM	5	2	1	0
%	62,5	25,0	12,5	0,0

MCP, mukokutani pemfigus; PM, pemfigus mukoza

Kod najvećeg broja pacijenata (53,1%) sa MCP i 62,5% sa PM sproveden je samo jedan terapijski modalitet, dok su kod ostalih sprovedena 2 i više terapijska modaliteta.

U vreme testiranja, 65/72 (90,3%) pacijenata je bilo pod terapijom, od toga je 13/72 pacijenata bilo u potpunoj kliničkoj remisiji, na terapiji održavanja; njih 6/13 je bilo na terapiji niskim dozama kortikosteroida (10-30 mg prednizona dnevno) i azatioprina (25-50 mg dvnevno), 3/13 samo na peroralnoj terapiji ciklofosamidom (50 mg dnevno), 2/13 pacijenta na terapiji azatioprinom (25-50 mg dnevno) i 2/13 pacijenta su bili na terapiji minimalnim dozama kortikosteroida (2,5-10 mg dnevno) prednizona.

Ostalih 7/72 pacijenata je bilo u kompletnoj remisiji bez ikakve terapije.

4.2.6. Komplikacije

Kod 33 (45,8%) pacijenata zabeležene su komplikacije (kako samog toka bolesti, tako i kao posledica neželjenih efekata terapije), dok je 39 (54,2%) bilo bez komplikacija. Najčešće zabeležene komplikacije prikazane su u tabeli 11.

Tabela 11: Najčešće zabeležene komplikacije

Komplikacije	Br pacijenata (N=72)	Procenat (%)
Toksični hepatitis	7	9,7
Jatrogeni diabetes	6	8,3
Kušingoidna gojaznost	7	9,7
Septikemija	7	9,7
Piokokcija	9	12,5
Leukopenija/anemija	6	8,3
Hipertenzija	4	5,6
Amenoreja	1	1,4
Reaktivacija TBC pluća	1	1,4
Pogoršanje psihoze	1	1,4
Duboka venska tromboza	1	1,4
Glaukom	1	1,4
Bez komplikacija	39	54,2

Od 72 pacijenata obuhvaćenih studijom, kod tri (4,2%) pacijenata, letalni ishod bio je najverovatnije vezan za komplikacije terapije odnosno samog toka bolesti, dok je pet (6,9%) umrlo prirodnom smrću.

4.3. Polimorfizam HLA lokusa

4.3.1. Alelska grupa- niska rezolucija

U cilju testiranja da li distribucija alela odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (HWE) (Tabela 12).

Tabela 12: Hardy-Weinberg-ova ravnoteža za ispitivane lokuse

Lokus	HWE u grupi pacijenata (p)	HWE u kontrolnoj grupi (p)
DRB1	$<2,2 \times 10^{-16}$	0,9806
DQB1	$4,0 \times 10^{-6}$	0,6249
DQA1	$9,7 \times 10^{-5}$	/

HWE, Hardy-Weinberg ekvilibrijum; p nivo značajnosti

Dobijeni rezultati pokazuju da su svi lokusi kod pacijenata su u neravnoteži, tj. devijaju značajno od ravnoteže, dok su, sa druge strane oba lokusa u kontroli u HWE. Učestalost DRB1 alelske grupe i poređenje sa zdravim kontrolama prikazano je u tabeli 13.

Tabela 13: Učestalost HLA-DRB1 (niska rezolucija)

DRB1 alel	Pacijenti N=72 n=144, (%)	Kontrole N=1992 n=3984, (%)	p	p adj	OŠ	(95% IP)
DRB1						
04	46 (31,9)	358 (9,2)	$4,95 \times 10^{-14}$	$4,45 \times 10^{-13*}$	4,754	(3,29-6,86)
14	44 (30,6)	216 (5,3)	$4,06 \times 10^{-20}$	$4,06 \times 10^{-19*}$	7,676	(5,25-11,23)
11	10 (6,9)	673 (16,9)	0,0008	0,007*	0,367	(0,19- 0,70)
13	10 (6,9)	527 (13,2)	0,031	0,118	0,489	(0,26-0,94)
16	8 (5,6)	433 (10,9)	0,039	0,118	0,482	(0,23-0,99)
01	7 (4,9)	410 (10,3)	0,033	0,118	0,445	(0,20-0,96)
07	7 (4,9)	284 (7,1)	0,405	0,524	0,666	(0,31-1,43)
03	6 (4,2)	433 (10,9)	0,008	0,053	0,357	(0,16-0,81)
15	5 (3,5)	392 (9,8)	0,087	0,053	0,329	(0,13-0,81)
12	1 (0,7)	76 (1,9)	0,524	0,524	0,359	(0,05-2,60)

N, broj ispitanika; n broj alela; p adj, korigovana p vrednost; OŠ, odnos šansi; IP, interval poverenja; *p adj<0,01

Poređenjem sa učestalošću alela u zdravoj populaciji, značajne razlike su zabeležene za DRB1*04 i DRB1*14 alel, koji su bili više učestalosti kod obolelih, sa visokim odnosom šansi (OŠ), 4,754 i 7,676, kao i za DRB1*11 alel koji je bio značajno niže učestalosti kod obolelih i mogao bi se smatrati protektivnim zbog nikog odnosa šansi, 0,367. Blizu nivoa značajnosti bili su i DRB1*03, i DRB1*15 alel, sa niskim OŠ i 95% intervalom poverenja (IP) manjim od 1, takođe sa potencijalnim protektivnim dejstvom (tabela 13).

Učestalost HLA-DQB1 alelske grupe i poređenje sa zdravim kontrolama prikazana je u tabeli 14. Nije pokazana značajna učestalost kod pacijenata nijedne od DQB1* alelskih grupa. DQB2* alelska grupa je bila niže učestalosti u odnosu na zdravu populaciju, ali nakon korekcije, ova razlika nije bila značajna iako je OŠ bio relativno nizak (tabela 14).

Tabela 14: Učestalost HLA-DQB1 alela (niska rezolucija)

DQB1	Pacijenti N=72, n=144, (%)	Kontrole N=159 n=318, (%)	p	p adj	OŠ	95% IP
05	59 (40,9)	105 (33,1)	0,115	0,361	1,408	(0,94-2,11)
03	58 (40,3)	106 (33,0)	0,172	0,361	1,349	(0,89-2,02)
06	14 (9,7)	46 (14,5)	0,180	0,361	0,637	(0,34-1,20)
02	12 (8,3)	54 (16,9)	0,014*	0,072	0,444	(0,23-0,86)
04	1 (0,7)	7 (2,2)	0,446	0,445	0,311	(0,04-2,55)

N, broj ispitanika; n, broj alela; p adj, korigovana p vrednost; OŠ, odnos šansi; IP, interval poverenja; *p<0,05

4.3.2. Aleli- visoka rezolucija

Učestalost alela u ispitivanim lokusima (DRB1 i DQB1) i poređenje sa zdravom populacijom prikazane su u tabelama 15 i 16.

Tabela 15: Učestalost HLA-DRB1 alela kod pacijenata sa PV (visoka rezolucija)

DRB1	Pacijenti N=72, n=144, (%)	Kontrole N=159 n=318, (%)	p	p adj	OŠ	95% IP
DRB1						
04:02	43 (29,9)	6 (2,7)	$7,39 \times 10^{-14}$	$1,63 \times 10^{-12*}$	15,469	(6,38-37,52)
14:54	19 (13,2)	12 (5,4)	0,008 [†]	0,150	2,685	(1,26-5,72)
14:04	19 (13,2)	0 (0)	$2,48 \times 10^{-08}$	$5,20 \times 10^{-07*}$	/ [†]	/
13:01	8 (5,6)	10 (4,5)	0,636	0,837	1,259	(0,48-3,27)
07:01	7 (4,9)	16 (7,1)	0,378	0,837	0,664	(0,27-1,66)
03:01	6 (4,2)	25 (11,2)	0,019 [†]	0,315	0,346	(0,14-0,87)
16:01	6 (4,2)	24 (10,7)	0,025 [†]	0,404	0,362	(0,14-0,91)
14:01	6 (4,2)	7 (3,1)	0,598	0,837	1,348	(0,44-4,09)
11:04	5 (3,5)	12 (5,4)	0,401	0,837	0,635	(0,22-1,84)
11:01	4 (2,8)	15 (6,7)	0,098	0,837	0,398	(0,13-1,22)
15:01	4 (2,8)	13 (5,8)	0,178	0,837	0,464	(0,15-1,45)
01:01	3 (2,1)	20 (8,9)	0,008 [†]	0,150	0,217	(0,06-0,74)
01:02	3 (2,1)	9 (4,0)	0,309	0,837	0,508	(0,14-1,91)
04:03	2 (1,4)	4 (1,8)	0,769	0,837	0,775	(0,14-4,28)
16:02	2 (1,4)	0 (0)	0,077	0,837	/ [†]	/
13:02	1 (0,7)	16 (7,1)	0,004 [†]	0,082	0,091	(0,01-0,69)
15:02	1 (0,7)	4 (1,8)	0,378	0,837	0,385	(0,04-3,48)
11:03	1 (0,7)	2 (0,9)	0,837	0,837	0,776	(0,07-8,64)
04:04	1 (0,7)	2 (0,9)	0,837	0,837	0,776	(0,07-8,64)
13:04	1 (0,7)	0 (0)	0,212	0,837	/ [†]	/
12:02	1 (0,7)	0 (0)	0,212	0,837	/ [†]	/
01:03	1 (0,7)	0 (0)	0,212	0,837	/ [†]	/

N, broj ispitanika; n, broj alela; p adj, korigovana p vrednost; OŠ, odnos šansi; IP, interval poverenja; [†], nedefinisan OŠ zbog odsustva datih alela u zdravoj populaciji; [†]p<0,01 ali nakon korekcije bez statističke značajnosti; *p adj<0,01

Postojala je visoko statistički značajna učestalost DRB1*04:02 (p adj= $1,63 \times 10^{-12}$, OŠ 15,469 i IP 6,38-37,52) i DRB1*14:04 (p adj= $5,20 \times 10^{-07}$, OŠ nedefinisan zbog odsustva datog alela u zdravoj srpskoj populaciji) alela kod pacijenata. Zabeležena je i veća učestalost DRB1*14: 54 alela (13,2%) ali bez značajne razlike, uz povećan OŠ (2,685) i IP preko 1 (1,26-5,72). DRB1*03:01, *16:01, *01:01 i *13:02 bili su niske učestalosti kod obolelih,

nakon korekcije nivo značajnosti nije dostignut. Opet, nizak OŠ za date alele bi mogao da ih svrsta u tzv. protektivne alele

Tabela 16: Učestalost DQB1 alela kod pacijenata sa PV (visoka rezolucija)

DQB1	Pacijenti N=72, n=144, (%)	Kontrole N=112 n=224, (%)	p	p adj.	OŠ	95% IP
03:02	46 (31,9)	22 (9,8)	$9,86 \times 10^{-08}$	$1,28 \times 10^{-06*}$	4,310	(2,46-7,56)
05:03	38 (26,4)	19 (8,5)	$3,70 \times 10^{-06}$	$4,44 \times 10^{-05*}$	3,868	(2,13-7,04)
03:01	11 (7,6)	37 (16,5)	0,014 ⁺	0,151	0,418	(0,21-0,85)
05:01	11 (7,6)	30 (13,4)	0,087	0,611	0,535	(0,26-1,10)
05:02	10 (6,9)	27 (12,1)	0,112	0,673	0,545	(0,26-1,16)
06:03	9 (6,3)	11 (4,9)	0,581	0,891	1,291	(0,52-3,19)
02:01	6 (4,2)	25 (11,2)	0,019 ⁺	0,167	0,346	(0,14-0,87)
02:02	6 (4,2)	10 (4,5)	0,891	0,891	0,930	(0,33-2,62)
06:04	2 (1,4)	15 (6,7)	0,018 ⁺	0,167	0,196	(0,04-0,87)
06:02	2 (1,4)	8 (3,6)	0,209	0,891	0,380	(0,08-1,82)
03:03	1 (0,7)	8 (3,6)	0,082	0,611	0,189	(0,02-1,53)
04:02	1 (0,7)	5 (2,2)	0,256	0,891	0,306	(0,04-2,65)
06:01	1 (0,7)	4 (1,8)	0,378	0,891	0,385	(0,04-3,48)

N, broj ispitanika; n, broj alela; p adj, korigovana p vrednost; OŠ, odnos šansi; IP, interval poverenja; *p adj<0,01; ⁺ p<0,05 ali nakon korekcije gubitak statističke značajnosti

Postojala je statistički značajna razlika učestalosti DQB1*03:02 (p adj= $1,28 \times 10^{-6}$) i DQB1*05:03 (p adj= $4,44 \times 10^{-5}$), koji su bili učestaliji kod pacijenata, odnosno jasna udruženost sa PV, OŠ 4,31, IP 2,46-7,56 (DQB1*03:02) i OŠ 3,868 i IP 2,13-7,04 (DQB1*05:03). Za DQB1*03:01, *02:01 i *06:04 alele, zabeležena je niža učestalost kod obolelih, sa niskim OŠ, uz gubitak statističke značajnosti nakon korekcije.

Budući da se DRB1*14:01:01 i DRB1*14:54 alel razlikuju u sekvenci aminokiselina na egzonu 3, iako je tipizacija u ovom istraživanju radjena SSP testovima kojima je moguće razlikovati DRB1*14:01 i DRB1*14:54 alel, u cilju jasnih rezultata upoređena su i oba alela (DRB1*14:01 i DRB1*14:54) sa sabranim zdravim kontrolama za oba alela. Nakon korekcije, razlika nije bila statistički značajna (p=0,0049, p adj=0,133).

4.3.3. Dvoalelski haplotipovi

Učestalosti 2-alelskih haplotipova u niskoj i visokoj rezoluciji i poređenje sa zdravim kontrolama prikazane su u tabelama 17 i 18.

Tabela 17: Učestalost HLA DRB1-DQB1 haplotipova kod pacijenata i zdravih kontrola (niska rezolucija)

Haplotip	Pacijenti N=72, n=144, (%)	Kontrole N=159 n=318, (%)	Učestalost haplotipova PV pacijenti/kontrole			
			p	p adj	OŠ	95% CI
DRB1*04-DQB1*03	45 (31,3)	28 (8,8)	$6,38 \times 10^{-9}$	$7,66 \times 10^{-8}$ *	4,409	(2,60 - 7,47)
DRB1*14-DQB1*05	44 (30,6)	20 (6,3)	$2,48 \times 10^{-11}$	$3,22 \times 10^{-10}$ *	6,135	(3,44-10,94)
DRB1*11-DQB1*03	10 (6,9)	54 (16,9)	0,004	0,041 ⁺	0,365	(0,18 - 0,74)
DRB1*13-DQB1*06	9 (6,3)	0	0,406	0,969	/	/
DRB1*16-DQB1*05	8 (5,6)	39 (12,3)	0,014	0,112	0,366	(0,16 - 0,84)
DRB1*01-DQB1*05	7 (4,9)	41 (12,9)	0,009	0,047 ⁺	0,345	(0,15 - 0,79)
DRB1*03-DQB1*02	6 (4,2)	41 (12,9)	0,004	0,041 ⁺	0,294	(0,12 - 0,71)
DRB1*07-DQB1*02	6 (4,2)	13 (4,1)	0,969	0,987	1,020	(0,38 - 2,74)
DRB1*15-DQB1*06	5 (3,5)	19 (5,9)	0,262	0,969	0,566	(0,20 - 1,55)
DRB1*04-DQB1*04	1 (0,7)	0	0,935	0,969	/	/
DRB1*07-DQB1*03	1 (0,7)	0	0,109	0,769	/	/
DRB1*12-DQB1*03	1 (0,7)	4 (1,3)	0,588	0,969	0,549	(0,01 - 4,96)
DRB1*13-DQB1*03	1 (0,7)	0	0,789	0,987	/	/

N, broj ispitanika; n, broj alela; p adj, korigovana p vrednost; OŠ, odnos šansi; IP, interval poverenja; *p adj.<0,01; ⁺ p adj<0,05

Najučestaliji haplotipovi kod pacijenata bili su DRB1*04-DQB1*03 (31,3%) i DRB1*14-DQB1*05 (30,6%) i postojala je jasna korelacija sa PV (p adj= $7,66 \times 10^{-8}$ i OŠ 4,409, odnosno p adj= $3,22 \times 10^{-10}$ i OR 6,135). Veći odnos šansi za DRB1*14-DQB1*05 bi ukazivao na nešto veći rizik razvoja PV kod pacijenata sa datim haplotipom u odnosu na DRB1*04-DQB1*03. Statistička značajnost zabeležena je i kod HLA-DRB1*11-DQB1*03, DRB1*01-DQB1*05 i DRB1*03-DQB1*02 haplotipa. Svi haplotipovi su bili niske učestalosti kod obolelih (p adj<0,05), sa niskim OŠ (<0,4) i IP <1, ukazujući na eventualne protektivne haplotipove. Od 72 pacijenta, njih 70 su bili nosioci nekog od patogenog alela (28 su bili nosioci DRB1*14-DQB1*05/DRB1*04 haplotipa, 26 samo DQB1*05 alelske grupe, bez DRB1*04 na drugom haplotipu, 16 samo DRB1*04 bez DQB1*05 alelske grupe na drugom haplotipu).

2 pacijenta nisu bili nosioci nekog patogenog alela (jedan pacijent je bio nosilac DRB1*11-DQB1*03 genotipa, homozigot, i drugi takođe homozigot, DRB1*13-DQB1*06, genotip).

U tabeli 18 prikazani su 2-alelski haplotipovi kod pacijenata sa PV u visokoj rezoluciji.

Tabela 18: Učestalost HLA DRB1-DQB1 haplotipova kod pacijenata i zdravih kontrola (visoka rezolucija)

Haplotip	Pacijenti f N=72 n=144, (%)	Zdravi f N=112 n=224, (%)	p	p adj.	OŠ	95% IP
DRB1*03:01-DQB1*02:01	6 (4,2)	25 (11,6)	0,022 [†]	0,836	0,356	(0,14-0,89)
DRB1*16:01-DQB1*05:02	6 (4,2)	23 (10,3)	0,041 [†]	1	0,391	(0,16-0,99)
DRB1*01:01-DQB1*05:01	3 (2,1)	19 (8,5)	0,032 [†]	1	0,317	(0,11-0,95)
DRB1*11:01-DQB1*03:01	4 (2,8)	15 (6,7)	0,109	1	0,409	(0,13-1,26)
DRB1*13:02-DQB1*06:04	1 (0,7)	15 (6,7)	0,007 [†]	0,189	0,100	(0,01-0,77)
DRB1*11:04-DQB1*03:01	5 (3,5)	12 (5,4)	0,433	1	0,654	(0,22-1,89)
DRB1*14:54-DQB1*05:03	16 (11,1)	11 (4,9)	0,021 [†]	0,662	2,499	(1,12-5,55)
DRB1*07:01-DQB1*02:02	6 (4,2)	10 (4,5)	0,936	1	0,958	(0,34-2,70)
DRB1*13:01-DQB1*06:03	7 (4,9)	10 (4,5)	0,814	1	1,126	(0,42-3,03)
DRB1*01:02-DQB1*05:01	3 (2,1)	9 (4,0)	0,161	1	0,346	(0,07-1,63)
DRB1*15:01-DQB1*06:02	2 (1,4)	8 (3,6)	0,224	1	0,391	(0,08-1,87)
DRB1*14:01-DQB1*05:03	6 (4,2)	7 (3,1)	0,817	1	1,148	(0,36-3,69)
DRB1*04:02-DQB1*03:02	43 (29,9)	6 (2,7)	1,91x10 ^{-13*}	5,55x10 ^{-12*}	15,047*	(6,19-36,61) *
DRB1*07:01-DQB1*03:03	1 (0,7)	6 (2,7)	0,185	1	0,261	(0,03-2,19)
DRB1*15:02-DQB1*06:01	1 (0,7)	4 (1,8)	0,394	1	0,396	(0,04-3,58)
DRB1*04:03-DQB1*03:02	1 (0,7)	3 (1,3)	0,578	1	0,529	(0,05-5,15)
DRB1*11:03-DQB1*03:01	1 (0,7)	2 (0,9)	0,855	1	0,796	(0,07-8,89)
DRB1*04:04-DQB1*03:02	1 (0,7)	1 (0,4)	0,737	1	1,604	(0,09-25,86)
DRB1*14:54-DQB1*05:01	2 (1,4)	1 (0,4)	0,314	1	3,232	(0,29-35,983)
DRB1*15:01-DQB1*06:03	2 (1,4)	1 (0,4)	0,314	1	3,232	(0,29-35,98)
DRB1*13:04-DQB1*03:02	1 (0,7)	0	0,385	1	/ ⁺	/
DRB1*1404-DQB1*05:01	2 (1,4)	0	0,147	1	/ ⁺	/
DRB1*14:04-DQB1*05:03	16 (11,1)	0	1,31x10 ^{-7*}	3,81x10 ^{-6*}	/ ⁺	/
DRB1*14:54-DQB1*05:02	1 (0,7)	0	0,385	1	/ ⁺	/
DRB1*16:02-DQB1*05:02	2 (1,4)	0	0,147	1	/ ⁺	/
DRB1*12:02-DQB1*03:01	1 (0,7)	0	0,385	1	/ ⁺	/
DRB1*04:03-DQB1*04:02	1 (0,7)	0	0,385	1	/ ⁺	/
DRB1*13:01-DQB1*06:04	1 (0,7)	0	0,385	1	/ ⁺	/
DRB1*01:03-DQB1*05:01	1 (0,7)	0	0,385	1	/ ⁺	/
DRB1*14:04-DQB1*05:02	1 (0,7)	0	0,385	1	/ ⁺	/

f, učestalost; N, broj pacijenata; n, broj haplotipova; p adj, korigovana p vrednost; IP, interval poverenja; * p adj<0,01; ⁺, OR nedefinisan zbog odsustva datih haplotipova u zdravoj populaciji; [†] p<0,05 i p<0,01 ali nakon korekcije bez statističke značajnosti

Kada su uzorci pacijenata testirani u visokoj rezoluciji, najučestaliji haplotipovi kod pacijenata bili su DRB1*04:02-DQB1*03:02 (29,9%), DRB1*14:04-DQB1*05:03 (11,1%) i DRB1*14:54-DQB1*05:03 (11,1%). Statistička značajnost zabeležena je za prva 2 haplotipa, ($p_{adj}=5,55 \times 10^{-12}$, OŠ 15,047 i IP 6,19-36,61, odnosno $p_{adj}=3,81 \times 10^{-6}$, sa nedefinisanim OŠ zbog odsustva datog haplotipa u zdravoj populaciji). Iako je bila viša, učestalost DRB1*14:54-DQB1*05:03 haplotipa ($p=0,021$), nakon korekcije nije dostigla nivo statističke značajnosti, mada je OŠ bio relativno visok (2,499) i IP preko 1 (1,124-5,55) što ga u haplotip od potencijalnog rizika za nastanak oboljenja. Za često opisivan haplotip udružen sa PV, DRB1*14:01-DQB1*05:03, nije bio značajne razlike učestalosti između pacijenata i zdrave populacije (4,2% kod pacijenata, 3,12% u zdravoj populaciji). Haplotipovi DRB1*16:01-DQB1*05:02, DRB1*01:01-DQB1*05:01, DRB1*13:02-DQB1*06:04, DRB1*03:02-DQB1*02:01 bili su niske učestalosti kod pacijenata ali se statistička značajnost izgubila nakon korekcije.

4.3.4. Polimorfizam DQA1* lokusa i učestalost troalelskih haplotipova

U grupi pacijenata ispitan je i DQA1 lokus. S obzirom da ne postoje podaci o učestalosti DQA1 lokusa u zdravoj populaciji Srbije, u tabeli 19 prikazana je samo učestalost DQA1 alela kod naših pacijenata sa PV, kao i kod pacijenata u drugim studijama. Kao što se vidi, kod naših pacijenata je bila povišena učestalost DQA1*01:04 i DQA1*03:01 alela što je razumljivo s obzirom na gametski disekvilibrijum sa DQB1*03:02 i DQB1*05:03.

Tabela 19: Učestalost HLA DQA1 alela kod pacijenata različitih pripadnosti i na različitim geografskim područjima

DQA1 alel	Pacijenti N=72, n=144, (%)	Zemlja [referenca]
01:01	8 (5,6)	20%, Korea [203], 63,2%, Pakistan [204], 1,92% Iran [51], 45,9% Indija ⁺ [54]
*01:02	13 (9,0)	40%, Korea [203], 5,3% Pakistan [204]
*01:03	9 (6,3)	13,3%, Korea [203], 7,9% Pakistan [204], 4,8% Iran [51]
01:04	37 (25,7)	33,3%, Korea [203], 25% Iran ⁺ [51], 15,62% Sardinija ⁺ , 37,5% Italija* [50], SAD, nejevrejska populacija, NP ⁺ [52], NP Japan*[205]
*01:05	5 (3,5)	NP
*01:07	1 (0,7)	NP
*02:01	7 (4,9)	0%, Korea [203], 2,6% Pakistan, 1,92% Iran [51], 3,12% Sardinija, 0% Italija [50]
03:01	39 (27,1)	66,7%, Korea [203], 15,8% Pakistan [204], 39,4% Iran [51], 40,62% Sardinija ⁺ , 21,87% Italija* [50], SAD, nejevrejska populacija, NP ⁺ [52], NP Japan*[205]
*03:03	8 (5,6)	NP
*05:01	6 (4,2)	0%, Korea [203], 5,3% Pakistan [204], 15,62% Sardinija, 15,62% Italija [50]
*05:05	10 (6,9)	SAD, nejevrejska populacija i Aškenazi Jevreji, NP ⁺ [52]
*06:01	1 (0,7)	0%, Korea [203]
Ukupno	144 (100)	

N, broj pacijenata; n, broj alela; *korigovana p vrednost < 0,05; ⁺korigovana p vrednost ≤ 0,01, NP nema podataka

Učestalost DQA1*01:01 alela u grupi naših pacijenata sa PV je bila dosta niža nego u drugim publikovanim serijama pacijenata, sa izuzetkom pacijenata sa PV u Iranu. Učestalost DQA1*01:04 i *03:01 je bila slična kod naših pacijenata sa PV kao i kod pacijenata drugih etničkih pripadnosti i na drugim geografskim područjima.

Učestalost najčešćih troalelskih haplotipova (DRB1/DQA1/DQB1) prikazana je u tabeli 20. Statistička analiza nije urađena budući da u zdravoj populaciji nije rađena učestalost na DQA1 lokusu.

Tabela 20: Učestalost troalelskih haplotipova kod obolelih

Haplotip	Učestalost haplotipova kod pacijenata	
	N=72	n=144, (%)
DRB1*-04:02-DQA1*-03:01-DQB1*-03:02	36	(25)
DRB1*-14:54-DQA1*-01:04-DQB1*-05:03	14	(9,7)
DRB1*-14:04-DQA1*-01:04-DQB1*-05:03	12	(8,3)
DRB1*-13:01-DQA1*-01:03-DQB1*-06:03	7	(4,9)
DRB1*-04:02-DQA1*-03:03-DQB1*-03:02	7	(4,9)
DRB1*-07:01-DQA1*-02:01-DQB1*-02:02	6	(4,2)
DRB1*-03:01-DQA1*-05:01-DQB1*-02:01	6	(4,2)
DRB1*-16:01-DQA1*-01:02-DQB1*-05:02	6	(4,2)
DRB1*-11:04-DQA1*-05:05-DQB1*-03:01	5	(3,5)
DRB1*-11:01-DQA1*-05:05-DQB1*-03:01	4	(2,8)
DRB1*-14:01-DQA1*-01:04-DQB1*-05:03	4	(2,8)

N, broj pacijenata; n broj haplotipova

Najveći broj pacijenata (25%) bili su nosioci DRB1*04:02-DQA1*03:01-DQB1*03:02 haplotipa.

4.3.5. Udruženost DRB1* i DQB1* alela sa pemfigusom kod drugih etničkih pripadnosti na različitim geografskim područjima

U tabelama 21 i 22 date su učestalosti najčešće opisivanih DRB1 i DQB1 alela udruženih sa PV kod različitih populacija na različitim geografskim područjima.

Tabela 21: Učestalost DQB1 alela udruženih sa PV kod pacijenata u Srbiji i kod pacijenata različitih etničkih pripadnosti i geografskih područja

Referenca	alel	Učestalost (%)	Zemlja/ Populacija	p	RR/OŠ
[206]	DQB1*05:03	26,4	Srbija	$4,44 \times 10^{-5}$	OŠ 3,969
[50]		15,6	Sardinija	$3,5 \times 10^{-3}$	RR 9,88
		37,5	Italija (centralni i južni deo)	10^{-6}	RR 78,20
[56]		62,2	Italija (južni deo)	$1,8 \times 10^{-12}$	NP
[54]		48,6	Indija	<0,0001	NP
[204]		57,9	Pakistan	0,02	NP
[52]		NP	SAD nejevrejska populacija	$1,39 \times 10^{-9}$	RR 14,12
		NP	SAD Aškenazi Jevreji	$1,29 \times 10^{-4}$	RR 3,0
[58]		22,4	Velika Britanija, E	<0,00001	OŠ 6,93
		47,4	Velika Britanija, IA	<0,00001	OŠ 6,18
[207]		10,2	Venecuela	0,023	OŠ 3,4
[72]		25,7	Francuska	$5,3 \times 10^{-5}$	RR 5,3
[59]		22,1	Slovačka	<0,0001	OŠ 10,40
[208]		30,8*	Španija	$5,1 \times 10^{-17}$	OŠ 10,7
[209]		29,78	Argentina	10^{-5}	RR 8,02
[206]	DQB1*05:02	6,2	Srbija	NS	OŠ 0,545
[56]		6,5	Italija (južni deo)	NS	NP
[51]		18,3	Iran	<0,0001	RR 3,5
[204]		5,3	Pakistan	NS	NP
		1,16	Slovačka	0,03	OŠ 0,144
[206]	DQB1*03:02	31,9	Srbija	$1,28 \times 10^{-6}$	OŠ 4,310
[50]		40,62	Sardinija	$1,2 \times 10^{-8}$	RR 39,48
		21,8	Italija (centralni i južni deo)	$4,7 \times 10^{-4}$	RR 5,19
[51]		32,7	Iran	<0,0001	RR 3,85
[52]		NP	SAD, nejevrejska populacija	$6,76 \times 10^{-5}$	RR 3,77
[58]		32,8	Velika Britanija, E	<0,00001	OŠ 4,94
		15,8	Velika Britanija IA	NS	OR 2,58
[72]		41,4	Francuska	$9,7 \times 10^{-7}$	RR 6,9
[59]		33,7	Slovačka	<0,0001	OŠ 7,70
[208]		88,5*	Španija	$5,1 \times 10^{-17}$	OŠ 49,1
[207]		15,3	Venezuela	NS	NP
[54]		16,2	Indija	NS	NP
[209]		53,2	Argentina	10^{-8}	RR 48,36

NP, nema podataka; NS, nije značajna razlika; RR, relativni rizik; OŠ, odnos šansi; IA, indoazijska populacija; E, evropska (bela) populacija; *, procenti se odnose na broj pacijenata

Tabela 22: Učestalost DRB1 alela udruženih sa PV kod pacijenata u Srbiji i kod pacijenata različitih etničkih pripadnosti i geografskih područja

Referenca	alel	Učestalost (%)	Zemlja/ Populacija	p	RR/OŠ
[206]	DRB1*04:02	29,9	Srbija	$1,63 \times 10^{-12}$	OŠ 15,469
[50]		40,6	Sardinija	$<10^{-8}$	RR 127,11
		21,9	Italija (centralni i južni deo)	$1,5 \times 10^{-6}$	RR 26,83
[56]		32,7	Italija (južni deo)	1×10^{-6}	NP
[59]		29,1	Slovačka	$<0,0001$	OŠ 22,75
[208]		80,8*	Španija	$4,7 \times 10^{-27}$	OŠ 100,8
[58]		27,1	Velika Britanija, E	$<0,00001$	OŠ nedefinisan
		14	Velika Britanija, IA	0,0003	OŠ 19,1
[52]		50*	SAD, nejevrejska populacija	$2,47 \times 10^{-14}$	RR 34,03
		96,9*	SAD, Aškenazi Jevreji	$1,59 \times 10^{-7}$	RR 4,96
[207]		28,6	Venecuela	$2,6 \times 10^{-12}$	OŠ 40,09
[51]		21,2	Iran	$<0,0001$	RR 7,16
[72]		31	Francuska	$5,4 \times 10^{-16}$	RR 91,6
[208]		80,8*	Španija	$4,7 \times 10^{-27}$	OŠ 100,8
[210]		83,6	Sirija	0,002	OŠ 13,9
[211]		71,4 [±]	Nemačka	$3,11 \times 10^{-11}$	NP
[211]		83,0 [±]	Egipat	$1,23 \times 10^{-8}$	NP
[212]		NP	Brazil	NP	OŠ 44,6
[209]		63,8	Argentina	10^{-8}	RR 18,23
[206]	DRB1*14:01	4,2	Srbija	NS	OŠ 1,348
[50]		15,6	Sardinija	$3,5 \times 10^{-3}$	RR 9,88
		37,5	Italija (centralni i južni deo)	$2,8 \times 10^{-6}$	RR 23,62
[52]		36,0*	SAD, nejevrejska populacija	$1,52 \times 10^{-6}$	RR 10,10
[51]		25,0	Iran	0,0001	RR 3,18
[207]		9,2	Venecuela	0,00002	OŠ 47,6
[72]		13,5	Francuska	0,001	RR 3,1
[208]		28,0*	Španija	$5,8 \times 10^{-5}$	OŠ 8,8
[209]		31,9	Argentina	10^{-6}	RR 12,86
[211]	DRB1*14:01:01 ili DRB1*14:54 ⁺	70,0 [±]	Nemačka	$1,37 \times 10^{-3}$	NP
[211]		50,0 [±]	Egipat	$3,15 \times 10^{-3}$	NP
[206]	DRB1*14:04	13,2	Srbija	$5,20 \times 10^{-7}$	OŠ nedefinisan
[58]		5,2	Velika Britanija, E	0,0009	OŠ 9,89
		42,1	Velika Britanija, IA	$<0,000001$	OŠ 10
[54]		45,9	Indija	$<0,0001$	NP
[204]		55,3	Pakistan	0,01	NP
[52]		11,0*	SAD, nejevrejska populacija	$9,21 \times 10^{-6}$	RR 204,02
[72]		9,4	Francuska	$4,2 \times 10^{-5}$	RR 17,2
[59]		4,7	Slovačka	0,0055	OŠ 24,71
[206]	DRB1*14:54	13,2	Srbija	0,15	OŠ 2,685
[58]		16,7	Velika Britanija, E	0,00007	OŠ 4,8
		2,6	Velika Britanija, IA	NS	NS
[59]		14,0	Slovačka	0,0002	OŠ 7,17
[211]	DRB1*08:04	77,0 [±]	Egipat	$4,6 \times 10^{-4}$	NP
[212]		NP	Brazil	NP	OŠ 18,6
[50]		12,5	Italija (centralni i južni deo)	$1,23 \times 10^{-3}$	RR 32,53

NS, nema značajne razlike; NP, nema podataka; OŠ, odnos šansi; RR, relativni rizik; IA, indoazijska populacija; E, evropska (bela) populacija; *, procenti se odnose na broj pacijenata; +, računato za oba alela; ±, visoka rezolucija rađena na 3 prve grupe cifara alela (*engl.* six digits)

DRB1*08:04 alel nije otkriven kod naših pacijenata.

Potvrdili smo kao i kod pacijenata drugih etničkih pripadnosti i na drugim geografskim područjima, značajnu razliku učestalosti alela DRB1*04:02, DRB1*14:04, DQB1*03:02 i DQB1*05:03 kod pacijenata sa PV.

Učestalosti najčešće opisivanih dvoalelskih haplotipova kod pacijenata sa PV u različitim populacijama prikazane su u tabeli 23.

Tabela 23: Haplotipovi (srednja i visoka rezolucija) kod pacijenata sa PV različite etničke pripadnosti i geografskih područja

Haplotip	Referenca	Učestalost (%)	Zemlja/Populacija	p	OŠ/RR
DRB1*04-DQB1*03:02	[51]	36,5	Iran	<0,0001	RR 3,95
	[72]	NP	Francuska	NP	NP
	[59]	33,7	Slovačka	<0,0001	OŠ 7,70
DRB1*04:02-DQB1*03:02	[206]	29,9	Srbija	$5,55 \times 10^{-12}$	OŠ 15,047
	[59]	29,1	Slovačka	<0,0001	OŠ 22,75
	[52]	22,8	SAD, nejevrejska populacija	$6,11 \times 10^{-13}$	NP
DRB1*04-DQB1*03	[207]	13,3	Venecuela	$8,6 \times 10^{-6}$	OŠ 17,875
	[206]	31,3	Srbija	$7,66 \times 10^{-8}$	OŠ 4,409
DRB1*14-DQB1*05	[53]	32,0	Turska	<0,0001	RR 8,60
	[206]	30,6	Srbija	$3,22 \times 10^{-10}$	OŠ 6,135
DRB1*14:01-DQB1*05:02	[53]	16,0	Turska	0,001	RR 6,02
	[51]	25,0	Iran	<0,0001	RR 3,34
DRB1*14:01-DQB1*05:03	[206]	4,2	Srbija	1	OŠ 1,148
	[52]	17,1	SAD, nejevrejska populacija	$1,06 \times 10^{-9}$	NP
	[207]	8,2	Venecuela	$8,6 \times 10^{-5}$	OŠ 41,58
DRB1*14:04-DQB1*05:03	[206]	11,1	Srbija	$3,81 \times 10^{-6}$	OŠ nedefinisan
	[59]	4,7	Slovačka	0,0055	OŠ 24,71
	[204]	NP	Pakistan	$p < 1 \times 10^{-6}$	NP
DRB1*14:54-DQB1*05:03	[206]	11,1	Srbija	NS	OŠ 2,499
	[59]	14,0	Slovačka	0,0002	OŠ 7,71

NP, nema podataka; NS, nema statističke značajnosti; RR, relativni rizik; OŠ, odnos šansi; p nivo značajnosti

4.3.6. Protektivni aleli kod pacijenata sa PV u Srbiji i kod različitih etničkih pripadnosti na drugim geografskim područjima

U tabelama 24 i 25 prikazani su aleli i alelske grupe sa značajno nižom učestalošću kod pacijenata (protektivni aleli). U tabeli su date populacije za koje postoje podaci o alelima sa niskom učestalošću kod obolelih od PV. Naši rezultati su u skladu sa dosadašnjim, s tim što je statistički značajno manja učestalost postojala samo za alelsku grupu DRB1*11. Ostale alelske grupe i aleli (DRB1 i DQB1) nakon korekcije nisu dostigli nivo značajnosti (tabela 24 i 25).

Tabela 24: Opisani protektivni DRB1 aleli i alelske grupe kod pacijenata sa PV različite etničke pripadnosti i geografskih područja

Alel/alelska grupa	Referenca	Učestalost (%)	Zemlja/ Populacija	p	OŠ/RR
DRB1*03	[206]	4,2	Srbija	NS*	OŠ 0,357
	[207]	3,3	Venecuela	0,041	OŠ 0,3
	[210]	2,2	Sirija	0,01	OŠ 0,1
DRB1*03:01	[206]	4,2	Srbija	NS*	OŠ 0,346
	[52]	NP	SAD, Aškenazi Jevreji	4,88x10 ⁻⁴	RR 0,05
	[58]	1,0	Velika Britanija, IA	0,0003	OŠ 0,05
		8,0	Velika Britanija, E	0,0009	OŠ 0,26
	[51]	1,9	Iran	0,01	RR 0,24
	[50]	0,0	Italija (južni i centr. deo)	0,027	RR 0,11
		0,0	Sardinija	6,3x10 ⁻⁵	RR 0,03
DRB1*04:03	[206]	1,4	Srbija	NS	OŠ 0,775
	[210]	1,6	Sirija	1,5x10 ⁻⁸	OŠ 0,03
DRB1*07	[206]	4,9	Srbija	NS	OŠ 0,666
	[59]	4,7	Slovačka	0,02	OŠ 0,290
	[51]	1,9	Iran	<0,0001	RR 0,24
	[52]	NP	SAD, Aškenazi Jevreji	2,13x10 ⁻⁴	RR 0,15
	[58]	14,0	Velika Britanija, E	NS*	OŠ 0,46
DRB1*07:01	[206]	6,9	Srbija	0,007	0,367
DRB1*11	[51]	13,5	Iran	0,01	RR 0,54
	[210]	19,7	Sirija	1x10 ⁻⁶	OŠ 0,25
	[213]	8,3	Turska (južni deo)	< 0,01 ⁺	OŠ 0,17
	[206]	3,5	Srbija	NS	OŠ 0,398
DRB1*11:04	[52]	NP	SAD, Aškenazi Jevreji	3,59x10 ⁻⁴	RR 0,16
	[206]	4,9	Srbija	NS*	OŠ 0,489
DRB1*13	[59]	4,7	Slovačka	0,001	OŠ 0,27
	[210]	5,5	Sirija	0,01	OŠ 0,2
	[206]	3,5	Srbija	NS*	OŠ 0,329
DRB1*15	[214]	1,9	Maroko	<0,0001 ⁺	OŠ 0,1
	[210]	6,6	Sirija	NS*	OŠ 0,4
	[58]	5,0	Velika Britanija, IA	0,0001	OŠ 0,17
		8,0	Velika Britanija, E	0,005	OŠ 0,3
	[51]	3,9	Iran	0,007	RR 0,32

NS*, p<0,05 ali nakon korekcije bez nivoa statističke značajnosti; NS bez statističke značajnosti; NP, nema podataka; IA, indoazijska populacija; E, evropska (bela) populacija

Tabela 25: Opisani protektivni DQB1 aleli i alelske grupe kod pacijenata sa PV različite etničke pripadnosti i geografskih područja

Alel/alelska grupa	Referenca	Učestalost (%)	Zemlja/ Populacija	p	OŠ/RR
DQB1*02	[206]	8,3	Srbija	NS*	OŠ 0,444
	[72]	7,0	Francuska	7×10^{-4}	RR 0,16
	[213]	13,3	Turska (južni deo)	0,047 ⁺	OŠ 0,47
DQB1*02:01	[206]	4,2	Srbija	NS*	OŠ 0,346
	[50]	9,4	Sardinija	$3,5 \times 10^{-3}$	RR 0,16
		0,0	Italija (južni i centr. deo)	$3,4 \times 10^{-4}$	RR 0,05
	[51]	2,9	Iran	<0,0001	RR 0,16
DQB1*03:01	[52]	NP	SAD, Aškenazi Jevreji	$2,3 \times 10^{-10}$	RR 0,02
	[206]	7,6	Srbija	NS	OŠ 0,418
	[52]	NP	SAD, Aškenazi Jevreji	$4,71 \times 10^{-6}$	RR 0,19
	[207]	9,2	Venecuela	NS*	OŠ 0,25
	[51]	15,4	Iran	0,001	RR 0,47
DQB1*05:02	[59]	4,7	Slovačka	0,0055	OŠ 24,71
	[204]	NP	Pakistan	$p < 1 \times 10^{-6}$	NP
	[206]	6,9	Srbija	NS	OŠ 0,545
	[59]	1,2	Slovačka	0,03	OŠ 0,144
DQB1*06	[206]	9,7	Srbija	NS	OŠ 0,637
	[214]	10,6	Maroko	0,01 ⁺	OŠ 0,3
	[59]	3,5	Slovačka	< 0,0001	OŠ 0,12
	[213]	10,0	Turska (južni deo)	0,011 ⁺	OŠ 0,35
DQB1*06:02	[206]	1,4	Srbija	NS	OŠ 0,380
	[58]	6,0	Velika Britanija, E	NS*	OŠ 0,25
	[51]	1,0	Iran	0,004	RR 0,2

NS*, $p < 0,05$ ali nakon korekcije bez nivoa statističke značajnosti; ⁺, p vrednost nije korigovana

4.3.7. Aleli i haplotipovi kod pacijenata različite etničke pripadnosti u Srbiji

Poređenja frekvencije alela i haplotipova u ovom istraživanju izvršena su za celu grupu pacijenata. Posebno poređenje romske populacije nije bilo moguće izvršiti zbog nedostatka podataka o učestalosti alela u zdravoj romskoj populaciji (*allele frequency net*). Svi pacijenti romske etničke pripadnosti su bili nosioci DRB1*14:04-DQB1*05:03 haplotipa, od toga je jedan pacijent bio homozigot, ostali heterozigoti.

Budući da je pacijenata ostalih etničkih pripadnosti (pored romske) bilo ukupno 5, od toga 3 pacijenta poreklom iz Crne gore, a kako su preostale dve pacijentkinje bile potomci iz mešanih brakova (srpske i rumunske, odnosno srpske i mađarske pripadnosti), poređenje učestalosti alela izvršeno je u odnosu na romsku (n=10) i Srbe i ostale (n=62).

Poređenjem učestalosti određenih alela, statistička značajnost postojala je u odnosu na distribuciju DRB1*04:02 ($p=0,013$), DRB1*14:04 i DRB1*14:54 ($p < 0,01$), DQB1*03:02 ($p=0,05$) i DQB1*05:03 ($p=0,01$) alela između pacijenata romske i drugih etničkih pripadnosti (tabela 26).

Tabela 26: Učestalost alela udruženih sa PV kod različitih etničkih pripadnosti u grupi naših pacijenata

Alel	Srbi i ostali N=62	%	Romi N=10	%	p
DRB1*04:02	40	64,5	2	20	0,013
DRB1*07:01	6	9,7	1	10	0,436
DRB1*14:01	6	9,7	0	0	0,586
DRB1*14:04	8	12,9	10	100	<0,01
DRB1*14:54	19	30,6	0	0	<0,01
DQB1*03:02	43	69,4	2	20	0,05
DQB1*05:03	27	43,5	10	100	0,01

N, broj pacijenata; p, nivo značajnosti

Pacijentkinja i mađarske i rumunske etničke pripadnosti, kao i 2/3 pacijenta porkelom iz Crne gore bili su nosioci DRB1*14:54, dok u romskoj populaciji pacijenata nije bilo nosilaca DRB1*14:54 alela. Samo je 9,7% pacijenata srpske nacionalnosti bilo nosilac DRB1*14:01 alela, kod ostalih etničkih pripadnosti nije zabeležen.

4.4. Imunološka ispitivanja

4.4.1. Antigenski profil

Kod svih ispitivanih pacijenata određivan je (u vreme testiranja) nivo antiDsg3 i Dsg1 antitela.

Pozitivne vrednosti smatrale su se one iznad 20 RU/ml. Kao što je već navedeno, za serume čije su koncentracije antitela bile iznad vrednosti kalibratora 1 (200 RU/ml) ponovljen je postupak sa razblaženjem 1:400 a potom su dobijene vrednosti množene sa 4.

Kod nekoliko pacijenata (n=8; od toga 4 u kompletnoj remisiji, 3 novoobolela i 1 pacijent u recidivu), vrednosti su i nakon razblaženja bile iznad vrednosti kalibratora (> 200 RU/ml) ali zbog nedostatka reagensa, nije bilo moguće raditi dalja razblaženja i te su vrednosti računane kao 800 RU/ml

Prosečna vrednost titra antiDsg3 (izražena medianom) iznosila je 153,60 RU/ml, interkvartilni raspon (30,63-254,05), a antiDsg1 26,65 RU/ml, interkvartilni raspon (2,03-163,33).

Pozitivan nalaz antiDsg3 postojao je kod 57/72 (79,2%) pacijenata, i to kod 52/64 (81,2%) pacijenata sa MCP i 5/8 (62,5%) pacijenata sa PM. Pozitivan nalaz antiDsg 1 postojao je kod

39/64 pacijenata sa MCP. Nijedan pacijent sa PM nije imao pozitivne vrednosti antiDsg1 (tabela 27).

Tabela 27: Nalaz antiDsg3 i antiDsg1 antitela kod pacijenata sa pemfigusom

Podtip PV	antiDsg3				antiDsg1				Ukupno	
	+		-		+		-		n	(%)
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
MCP	52	(81,2)	12	(18,8)	39	(60,9)	25	(39,1)	64	(100,0)
PM	5	(62,5)	3	(37,5)	0	(0,0)	8	(100,0)	8	(100,0)

MCP, mukokutani pemfigus; PM, pemfigus mukoza; n, broj pacijenata

Posmatrano samo za novoobolele pacijente, antiDsg1 antitela su bila pozitivna kod 30/36 (83,3%) pacijenata sa MCP, a antiDsg3 kod 34/40 (85%) novobololelih pacijenata (PM i MCP).

Korelacija antigenskog profila i kliničkog fenotipa (antiDsg3+/antiDsg1+ ili antiDsg3+/antiDsg1- kod MCP, odnosno antiDsg3+ kod PM) postojala je kod 57/72 (79,1%) pacijenata dok su kod 15/72 (20,9%) pacijenata (12 sa MCP i 3 sa PM) postojala odstupanja, tabela 28.

Od dvanaest pacijenata sa MCP, kod njih pet su i antiDsg1 i antiDsg3 antitela bila negativna, (od toga tri pacijenta je bilo u remisiji na terapiji održavanja, a dva novoobolela pacijenta). Kod ostalih sedam pacijenata takođe je postojalo odstupanje od antigenskog profila (antiDsg3-/antiDsg1+); njih pet su bili novooboleli pacijenti, jedan pacijent je bio u recidivu a jedan pacijent je bio u remisiji na terapiji održavanja.

Kod tri pacijenta sa PM postojale su negativne vrednosti antiDsg3, od toga su dva pacijenta bila u remisiji (jedan bez terapije, drugi na terapiji održavanja) dok je treći pacijent bio novooboleli, sa niskim PDAI (PDAI= 11).

Kod 32/64 (50%) pacijenta sa MCP bio je pozitivan titar i antiDsg1 i antiDsg3 antitela a kod 20/64 (31,2%) pozitivan titar antiDsg3 a negativan antiDsg1 (tabela 28).

Odsustvo antitela (antiDsg3-/antiDsg1-) postojalo je kod osam pacijenata, od toga kod dva novoobolela (jedan sa PM i drugi sa MCP), kod jednog pacijenta sa MCP u recidivu, ostalih pet pacijenata je bilo u kompletnoj remisiji. Odstupanje od antigenskog profila (antiDsg3-/antiDsg1+) postojao je kod sedam pacijenata sa MCP (pet novoobolelih, jedan u recidivu i

jedan u remisiji). AntiDsg3+/antiDsg1- kod pacijenata sa MCP je zabeležen kod 20/64 pacijenata (četiri novoobolela, pet u recidivu, ostalih jedanaest u remisiji), tabela 28.

Tabela 28: Antigenski profil pacijenata sa pemfigusom

Podtip pemfigusa	antiDsg1- antiDsg3-	antiDsg1+ antiDsg3-	antiDsg1- antiDsg3+	antiDsg1+ antiDsg3+	Ukupno
PM	3	0	5	0	8
%	37,5	0,0	62,5	0,0	100,0
MCP	5	7	20	32	64
%	7,8	10,9	31,2	50,0	100,0
Ukupno	8	7	25	32	72
%	11,1	9,7	34,7	44,4	100,0

PM, pemfigus mukoza; MCP, mukokutani pemfigus

4.4.1.1. Titar antiDsg1 i antiDsg3

Prosečne vrednosti antiDsg1 i antiDsg3 u odnosu na stadijum i stepen aktivnosti bolesti (PDAI) prikazane su u tabeli 29.

Tabela 29: Vrednosti titra antiDsg1 i 3 antitela i PDAI kod pacijenata u različitim fazama bolesti

Stadijum bolesti	antiDsg1 (RU/ml)*	antiDsg3 (RU/ml)*	PDAI*
Novooboleli (n=40)	131,2 (20,5-183,4)	172,7 (93,8-281,9)	50,5 (36,0-59,7)
Prethodno lečeni- recidiv (n=12)	3,0 (1,3-157,8)	155,3 (122,1-249,5)	26,5 (18,78-45,3)
Kompletna remisija, pod terapijom (n=13)	2,5 (0,7-22,8)	21,7 (2,2-203,7)	8,5 (3,8-11,3)
Kompletna remisija, bez terapije (n=7)	2,5 (0,8-5,9)	152,2 (33,4-800,0)	0,5 (0-1)
Ukupno (n=72)	26,7 (2,0-163,3)	153,6 (30,6-254,1)	32,5 (10,3-53,8)

*median (interkvartilni raspon)

Kruskal-Wallisovom neparametarskom analizom, značajne razlike u visini titra antiDsg1 zabeležene su između novoobolelih i ostale tri ispitivane grupe pacijenata. Značajne razlike u visini titra antiDsg 3 zabeležene su između pacijenata u remisiji, na terapiji u odnosu na novoobolele ($p=0,024$) odnosno na pacijente u recidivu ($p=0,048$). Nakon Bonferroni korekcije, značajne razlike postojale su samo u visini titra antiDsg1 kod novoobolelih u

odnosu na pacijente u remisiji, na terapiji (p adj=0,01) i pacijenata u remisiji bez terapije (p adj=0,011).

Kod pacijenata u remisiji, na terapiji, negativna antiDsg1 antitela zabeležena su kod devet, a negativna antiDsg3 antitela kod šest pacijenata. Kod svih pacijenata u kompletnoj remisiji antiDsg1 antitela su bila negativna, dok su se kod 6/7 održavala jako visoka antiDsg3 antitela. Vrednosti antiDsg1 i 3 kod pacijenata u remisiji prikazane su u tabelama 30 i 31.

Tabela 30: Vrednosti antiDsg3 i 1 kod pacijenata u remisiji na terapiji održavanja

Pacijenti u kliničkoj remisiji	Podtip pemfigusa	antiDsg1 (RU/ml)	antiDsg3 (RU/ml)
N1	MCP	0,5	1,5
N2	MCP	162,2	3,7
N3	MCP	21,8	28,1
N4	MCP	25,8	2,0
N5	MCP	0,6	4,3
N6	MCP	7,5	233,8
N7	MCP	0,9	2,0
N8	MCP	1,8	150,0
N9	MCP	85,5	62,4
N10	MCP	3,5	213,0
N11	MCP	2,0	287,2
N12	MCP	2,9	193,7
N13	PM	0,7	15,3

PM, pemfigus mukoza; MCP, mukokutani pemfigus

Tabela 31: Vrednosti antiDsg3 i 1 kod pacijenata u remisiji bez terapije

Pacijenti u kompletnoj remisiji	Podtip pemfigusa	Remisija (meseci)	antiDsg1 (RU/ml)	antiDsg3 (RU/ml)
N 1	MCP	27	8,3	800,0
N 2	MCP	48	5,1	800,0
N3	MCP	6	7,7	800,0
N4	MCP	88	1,5	91,3
N5	MCP	102	3,5	213,0
N6	MCP	6	7,7	800,0
N7	PM	8	0,3	3,8

PM, pemfigus mukoza; MCP, mukokutani pemfigus

4.4.1.2 AntiDsg1 i 3 u odnosu na podtip pemfigusa i stepen aktivnosti bolesti

Korelacija titra autoantitela i stepena aktivnosti bolesti prikazana je u tabeli 32. Spearman-ovom neparametarskom analizom, pokazana je značajna korelacija između visine titra i antiDsg1 i antiDsg3 i stepena aktivnosti bolesti, kod oba podtipa PV.

Tabela 32: Korelacija stepena aktivnosti bolesti i antiDsg1 i 3

Podtip pemfigusa	Antitela	PDAI koeficijent korelacije (Rho)	p
PM (n=8)	Dsg 1	0,539	0,168
	Dsg 3	0,810*	0,015*
MCP (n=64)	Dsg 1	0,640**	0,000**
	Dsg 3	0,317*	0,011*
Ukupno (n=72)	Dsg 1	0,679**	0,000**
	Dsg 3	0,363*	0,020*

PM, pemfigus mukoza; MCP, mukokutani pemfigus; * p<0,05; ** p<0,01

Kod pacijenata sa PM postojala je i značajna korelacija i između broja zahvaćenih sluzokoža i koncentracije antiDsg3 antitela (Rho=0,730; p=0,040) dok kod MCP nije (tabela 33). Kod pacijenata sa MCP postojala je značajna korelacija između kutanog PDAI i nivoa antiDsg1 antitela (Rho=0,662; p<0,001), dok značajnosti nije bilo između koncentracije antiDsg3 i kutanog PDAI (tabela 33).

Tabela 33: Korelacija stepena aktivnosti bolesti, antiDsg antitela i broja zahvaćenih sluzokoža

Podtip pemfigusa	Q _{Dsg3M}	p	Q _{PDAIM}	p	Q _{Dsg1KPAI}	p
PM (n=8)	0,730	0,040	0,574	0,137		
MCP (n=64)	0,115	0,365	0,229	0,069	0,662	<0,001 ^a
					0,227	0,072 ^b
Ukupno (n=72)			0,204	0,086	NP	NP

PM, pemfigus mukoza; MCP, mukokutani pemfigus; Q_{Dsg3M}, koeficijent korelacije antiDsg i broja zahvaćenih sluzokoža; Q_{PDAIM}, koeficijent korelacije PDAI mukoza i broja zahvaćenih sluzokoža; Q_{Dsg1KPAI}, koeficijent korelacije antiDsg1 i kutanog PDAI ^aantiDsg1; ^bantiDsg 3; NP- nije primenljivo

4.4.2. IIF test

IIF test je urađen kod svih pacijenata u isto vreme kad i ELISA. Vrednosti IIF testa kretale su se od 0 (negativan IIF) do 1/1280. Median vrednosti IIF testova i kod pacijenata sa PM i MCP iznosio je 1/40. Vrednosti IIF testa u odnosu na stadijum bolesti prikazane su u tabeli 34.

Tabela 34: Vrednost IIF testa kod pacijenata

Oboleli	N	Med	Minimum	Maksimum
Novooboleli	40	80	0	1280
Recidiv	12	80	0	640
Kompletna remisija, na terapiji	13	20	0	320
Kompletna remisija, bez terapije	7	40	0	640
Ukupno	72			

N, broj pacijenata; Med, median

IIF test je bio pozitivan kod 59/72 (81,9%) i negativan kod 13/72 (10,1%) pacijenata. Negativan IIF je zabeležen kod dva novoobolela pacijenta sa MCP j jednog sa PM, kao i kod dva pacijenta u recidivu (jedan PM, drugi MCP). Ostali pacijenti sa negativnim IIF testom bili su u remisiji. Od 13 pacijenata sa negativnim IIF testom, antiDsg1 antitela su bila pozitivna kod 4 (30,8%) a antiDsg3 antitela kod 5 (38,5%) pacijenata. Od 59 pacijenata sa pozitivnim IIF testom, antiDsg1 antitela su bila pozitivna kod 35 (59,3%) a antiDsg3 antitela kod 52 (88,1%) pacijenta. U odnosu na pozitivne odnosno negativne vrednosti antiDsg 1 i 3, nalaz pozitivnog odnosno negativnog IIF testa prikazan je u tabeli 35.

Tabela 35: IIF test i antigenski profil kod pacijenata sa PV

IIF		Antigenski profil				Ukupno
		antiDsg3- antiDsg1-	antiDsg1+ antiDsg3-	antiDsg1- antiDsg3+	antiDsg1+ antiDsg3+	
Negativan (0)	Broj pacijenata	6	2	3	2	13
	% (IIF)	46,2	15,4	23,1	15,4	100,0
Pozitivan ($\geq 1/20$)	Broj pacijenata	2	5	22	30	59
	% (IIF)	3,4	8,5	37,3	50,8	100,0
Ukupno	Broj pacijenata	8	7	25	32	72
	% (IIF)	11,1	9,7	34,7	44,4	100,0

Pozitivne vrednosti IIF testa podeljene su u 3 grupe- nisko pozitivan (1/20, 1/40), pozitivan (1/80) i visoko pozitivan ($\geq 1/160$). Prema podvrsti pemfigusa i u odnosu na pozitivne ili negativne vrednosti antiDsg1 i 3 antitela, IIF vrednosti su prikazane u tabeli 36.

Spearman-ovom neparametarskom analizom pokazana je visoko statistička značajna korelacija i između visine titra IIF testa i antiDsg3 antitela (Rho=0,742, $p<0,01$) i antiDsg1 antitela (Rho=0,372, $p<0,01$), kao i PDAI skora (Rho=0,426, $p<0,01$).

Tabela 36: IIF, antigenski profil i stepen aktivnosti bolesti kod oba podtipa pemfigusa

Podtip pemfigusa	antiDsg1- antiDsg3-	antiDsg1+ antiDsg3-	antiDsg1- antiDsg3+	antiDsg1+ antiDsg3+	Ukupno
MCP (n=64)	5 (7,8%)	7 (10,9%)	20 (31,2%)	32 (50%)	64 (100%)
IIF negativan	3	3	3	3	12 (18,75%)
IIF: 1/20, 1/40	2	3	7	8	20 (31,25%)
IIF: 1/80	0	1	2	9	12 (18,75%)
IIF: $\geq 1/160$	0	0	8	12	20 (31,25%)
PDAI, median (IQR)	9 (1,5-24,0)	32 (11,0-36,0)	10,5 (1,75-46,0)	53,5 (37,5-65,7)	38 (11,3-54,0)
PM (n=8)	3 (37,5%)	0	5	0	8 (100%)
IIF: negativan	2	0	2	0	4 (50%)
IIF: 1/20, 1/40	1	0	0	0	1 (12,50%)
IIF: 1/80	0	0	2	0	2 (25%)
IIF: $\geq 1/160$	0	0	1	0	1 (12,50%)
PDAI, median (IQR)	3	0	21 (8-26,5)	0	10 (4-23,25)

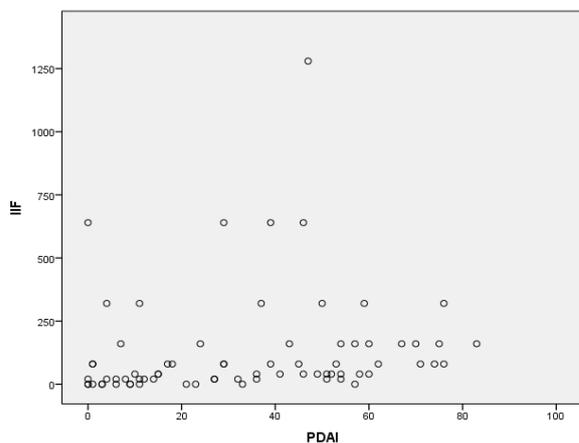
MCP, mukokutani pemfigus; PM, pemfigus mukoza; *IQR, interkvartilni rang; IIF, indirektna imunofluorescencija

Statistička značajnost pokazana je kod pacijenata sa mukokutanim pemfigusom sa antigenim profilom antiDsg1+/Dsg3+ u odnosu na one sa antiDsg1-/Dsg3+, $p=0,029$.

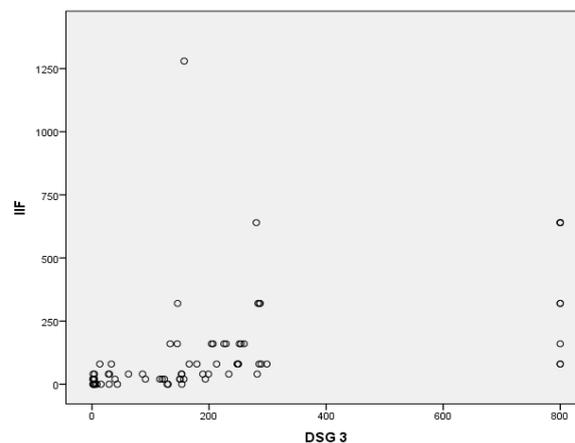
Statistička značajnost ispitivanih neparametarskih korelacija IIF testa i antiDsg1 i 3 (Kappa vrednost) pokazala je $\kappa=0,178$ (IIF/Dsg1) i $\kappa=0,476$ (IIF/Dsg3), odnosno da postoji vrlo dobra saglasnost vrednosti IIF testa i nivoa antiDsg3 dok je slaba za IIF i antiDsg1. Odnosno, navedeni rezultati ukazuju da i IIF test kao i ELISA, validan marker procene aktivnosti bolesti.

Na grafikonu 4 prikazana je korelacija PDAI i IIF vrednosti, na grafikonu br. 5 korelacija IIF testa i antiDsg3 i na grafikonu br. 6 korelacija IIF testa i antiDsg1.

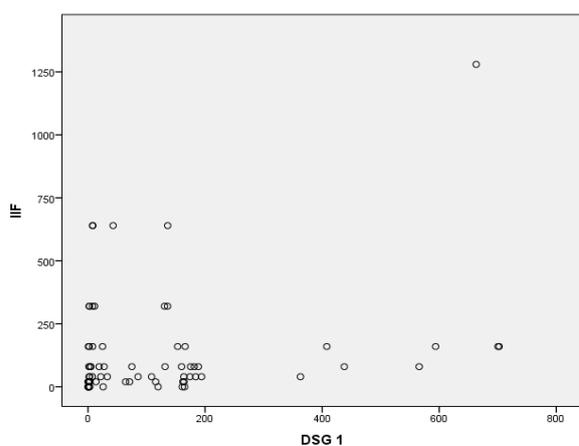
Grafikon 4: Korelacija IIF i PDAI



Grafikon 5: Korelacija IIF i ELISA (antiDsg3)



Grafikon 6: Korelacija IIF i ELISA (antiDsg1)



4.5. Korelacija između genotipova, kliničkog toka bolesti i titrova antiDsg3 i Dsg1 antitela

4.5.1. Aleli HLA-DRB1 i DQB1 lokusa - korelacija sa kliničkim fenotipom, nivoom autoantitela i težinom kliničke slike i učestalost među polovima

4.5.1.1. Korelacija sa kliničkim fenotipom

Nosilaca DRB1*04:02 bilo je 39 (60,9%) pacijenata sa MCP i 3 (37,5%) sa PM. Nije bilo statističke značajnosti između dve podgrupe pemfigusa, verovatno zbog malog uzorka (PM=8). Ostali aleli za koje je u ovom istraživanju pokazana udruženost sa PV, bili su slične distribucije kod oba podtipa pemfigusa (tabela 37).

Tabela 37: Učestalost alela udruženih sa PV u odnosu na podtipove

Podtip pemfigusa	Alel, N= 72 (%)					Ukupno
	DRB1*04:02	DRB1*14:04	DRB1*14:54	DQB1*03:02	DQB1*05:03	
MCP	39 (60,9)	16 (25,0)	17 (25,6)	45 (64,1)	32 (50,0)	64
MP	3 (37,5)	2 (25,0)	2 (25,0)	4 (50,0)	5 (62,5)	8

MCP, mukokutani pemfigus; PM, pemfigus mukoza; N, broj pacijenata

4.5.1.2. Učestalost DRB1 i DQB1 alela među polovima

U odnosu na polove, razlika u učestalosti određenih alela udruženih sa PV (n=72) postojala je za DRB1*14 alelsku grupu (50% muškaraca i 26,1% žena, p=0,041) odnosno za DRB1*14:04 alel, koji je bio češći kod muškaraca (42,3% muškaraca i 15,2% žena, p=0,011). DQB1*05:03 alel je takođe bio češći kod muškaraca (50% muškarci, 23,9% žene, p=0,024).

DRB1*04:02-DQB1*03:02 haplotip je bio češći kod ženskih (63,4%) nego kod muških (38,5%) pacijenata, p=0,017. Nije bilo značajnih razlika učestalosti DRB1*04-DQB1*05:03 haplotipa među polovima.

4.5.1.3. Uzrast oboljevanja kod nosioca različitih alela i haplotipova

U tabeli 38 prikazana je prosečna starost oboljevanja u odnosu na prisustvo ili ne određenog alela odnosno haplotipa. Značajne razlike postojale su kod onih pacijenata nosilaca DRB1*14:04 alela, kod kojih je prosečni uzrast oboljevanja iznosio 46,17 godina ± SD 16,05 u odnosu na one bez tog alela, koji su oboljevali u proseku sa 56 godina ± SD 14,24.

Takođe su u ranijim godinama obojevali pacijenti nosioci DRB1*14 (*14:04, *14:54)-DQB1*05:03 haplotipa u odnosu na one koji nisu bili nosioci datog haplotipa. Druge značajne razlike nisu zabeležene (tabela 38).

Tabela 38: Prosečna starost oboljevanja kod nosilaca različitih alela/haplotipova

Alel/ haplotip		Uzrast u vreme početka bolesti				p
		SV	SD	Minimum	Maksimum	
DRB1*04:02	ne	52,97	16,37	20	82	0,789
	da	53,95	14,52	24	88	
DRB1*14:04	ne	56,00	14,24	24	88	0,016*
	da	46,17	16,05	20	79	
DRB1*14:54	ne	53,49	14,87	20	88	0,962
	da	53,68	16,57	24	84	
DQB1*05:03	ne	56,63	13,52	24	88	0,094
	da	50,62	16,30	20	84	
DQB1*03:02	ne	52,15	16,99	20	82	0,551
	da	54,38	14,18	24	88	
DRB1*14-DQB1*05:03	ne	56,95	13,99	24	88	0,05*
	da	49,94	15,82	20	84	
DRB1*04:02/*DRB1*14-DQB1*03:02/DQB1*05:03	ne	55,27	15,18	20	88	0,082
	da	47,94	14,33	24	84	
DRB1*04:02-DQB1*03:02	ne	53,55	16,35	20	82	0,997
	da	53,54	14,50	24	88	

SV, srednja vrednost; SD, standardna devijacija; *p≤0,05

4.5.1.4. Korelacija sa nivoom antiDsg3 i antiDsg1i stepenom aktivnosti bolesti

S obzirom da je 20 pacijenata bilo u remisiji, (7 u kompletnoj remisiji bez terapije i 13 pacijenata u kompletnoj remisiji na terapiji održavanja) korelacija određenih alela udruženih sa PV (nosilaca datih alela) sa visinom titra antiDsg1 i 3 i sa stepenom aktivnosti bolesti (PDAI) izvršena je na 52 pacijenta u aktivnoj fazi bolesti (40 novoobolelih i 12 u recidivu). Rezultati su prikazani u tabeli 39.

Tabela 39: Korelacija alela udruženih sa PV sa visinom titra antiDsg1 i 3 i PDAI (n= 52)

Alelska grupa, aleli i kombinacija alela	prisutan	Dsg1 (RU/ml)*; p	Dsg3 (RU/ml)*; p	PDAI*; p
DRB1*04:02	ne	71,0 (7,7-363,3); 0,818	157,5 (33,1-280,7); 0,692	37,0 (24,0-60,0); 0,311
	da	131,7 (11,2-166,0)	166,1 (123,7-251,8)	50,0 (32,0-57,0)
DRB1*14:04	ne	71,0 (5-165,5); 0,108	156,9 (123,7-259,9); 0,591	45,0 (24,0-54,0); 0,301
	da	159,9 (33,0-194,0)	179,3 (29,3-250,0)	47,0 (36,0-60,0)
DRB1*14:54	ne	133,3 (7,7-175,2); 0,283	155,3 (86,4-248,1); 0,093	50,0 (33,0-59,0); 0,081
	da	53,7 (7,9-136,1)	252,2 (123,7-800,0)	35,5 (24,0-50,0)
DQB1*05:03	ne	135,9 (2,5-181,6); 0,593	153,6 (115,9-248,1); 0,455	52,0 (41,0-58,0); 0,178
	da	75,0 (11,2-161,2)	198,9 (120,0-280,7)	37,0 (29,0-57,0)
DQB*03:02	ne	71,0 (7,9-194,0); 0,830	157,5 (33,1-254,8); 0,544	37,0 (27,0-57,0); 0,323
	da	131,7 (3,0-174,2)	166,1 (123,7-259,9)	50,0 (29,0-58,0)
Kombinacija DRB1*04:02/DQB1*05:03	ne	119,8 (3,0-188,5); 0,816	156,9 (86,4-254,8); 0,267	47,0 (29,0-57,0); 0,422
	da	115,6 (43,0 -153,2)	206,8 (123,7-800 ,0)	39,0 (29,0-53,0)

* Median (interkvartilni rang); p nivo značajnosti

Iako je evidentno da su postojale razlike u median vrednostima i antiDsg1 i antiDsg 3 antitela između pacijenata nosilaca i onih koji nisu bili nosioci određenih alela, zbog velikog varijabiliteta, statistički značajne razlike nisu zabeležene. Prosečne vrednosti antiDsg3 i antiDsg1 i PDAI bile su svakako više kod pacijenata nosilaca patogenih alela sem prosečnih vrednosti antiDsg1 i PDAI kod pacijenata nosilaca ili ne DRB1*14:54 ili DQB1*05:03 alela.

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je učestalost polimorfizama HLA-DRB1*, DQB1* i DQA1* alela kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom i poređena je sa distribucijom ispitivanih alela kod zdravih kontrola iz Srbije kao i sa distribucijom ovih alela kod pacijenata sa pemfigusom u drugim zemljama. Kontrolnu grupu u ovom istraživanju činili su dobrovoljni davaoci kostne srži prijavljeni u Registar dobrovoljnih davalaca kostne srži Srbije a rezultati njihove HLA tipizacije su objavljeni u doktorskoj disertaciji dr Zorane Andrić 2014 [42]. Podaci za distribuciju HLA alela kod pacijenata sa pemfigusom u drugim zemljama prikupljeni su pretragom literature na PubMed pretraživaču. Broj pacijenata, kao i broj zdravih osoba, odnosno kontrola, uključenih u ovo istraživanje bio je dovoljan kako bi se postigla Hardy-Weinberg ravnoteža što je omogućilo adekvatnu analizu i interpretaciju dobijenih rezultata.

Pemfigus vulgaris je globalno različito zastupljen među ženama i muškarcima. U nekim studijama, odnos je približno 1:1 [4, 8, 11, 19]. U našem istraživanju pacijenti su bili češće ženskog pola, odnos M:Ž iznosio je 1:1,77. Zastupljenost polova kod PV u Vojvodini i zemljama u okruženju (Makedonija, Bugarska, Rumunija, Turska) kreće se od 1:1,11 (Bugarska) do 1:1,75 u severozapadnom delu Rumunije [4, 8, 10, 11, 19]. U mediteranskim zemljama je zabeležena veća učestalost PV kod žena, kao npr. u Grčkoj gde je odnos M:Ž - 1:2,25 [9], na Siciliji, M:Ž - 1:2,22 [26] i susednoj Hrvatskoj, gde je odnos M:Ž - 1:2 [26, 215]. Veća učestalost PV kod ženskog pola zabeležena je u Aziji, u Kuvajtu - M:Ž - 1:1,4 [15], Bangladešu - M:Ž - 1:1,3 [31] i Iranu - M:Ž - 1:1,5 [6] kao i u zemljama severne Afrike [17]. Kod pacijenata romske etničke pripadnosti u ovom istraživanju, odnos muškaraca i žena bio je drugačiji, M:Ž - 2,33:1. O učestalosti pemfigusa kod različitih polova za pacijente romske etničke pripadnost nema podataka za populacije koje su im genetski slične, kao što su populacija Roma u Italiji, Makedoniji ili Rumuniji.

Najveći broj pacijenata bio je srpske etničke pripadnosti (79,2%). Pacijenti romske etničke pripadnosti bili su zastupljeni sa 13,9%. U drugim ispitivanim serijama u zemljama u okruženju, učestalost romske etničke populacije kretala se od 8,9% u Bugarskoj [8] do 14,3% u Makedoniji [4].

Ostali pacijenti bili su 3 pacijenta poreklom iz Crne Gore (2 žene i 1 muškarac) i po jedna pacijentkinja rumunskog odnosno mađarskog porekla. Svi pacijenti su bili rođeni na teritoriji Srbije (pacijentkinje rumunske i mađarske pripadnosti), odnosno bivše Jugoslavije, u Crnoj Gori (pacijenti poreklom iz Crne Gore). Pacijentkinje rumunske odnosno mađarske etničke

pripadnosti bile su potomci iz mešovityh brakova (jedan od roditelja je bio srpske etničke pripadnosti).

Prosečni uzrast oboljevanja za pacijente srpske etničke pripadnosti u ovom istraživanju sličan je prosečnoj starosti oboljevanja od PV prethodno objavljenim od strane Golušina i sar. za teritoriju Vojvodine [19], kao i u zemljama Balkanskog poluostrva i drugim evropskim zemljama [4, 8, 12, 26]. Ranije oboljevanje svakako je zabeleženo kod Roma u našoj seriji (39,5 godina). U Makedoniji je kod pacijenata romske etničke pripadnosti uzrast pri oboljevanju od PV bio je viši, 44,2 godine [4]. U mediteranskim zemljama i Aziji prosečna starost pri oboljevanju je niža, od 36,5- 43 godine [6, 11, 15, 25, 31]. U Velikoj Britaniji prosečan uzrast pri oboljevanju je dosta viši - 71 godina [14].

Kod naših pacijenata, nešto niža starost pacijenata na početku bolesti zabeležena je kod muškaraca (51,2 godine) u odnosu na žene (54,9 godina). Michailidou i saradnici su u seriji od 129 pacijenata sa PV takođe imali nižu starost pacijenata na početku bolesti kod muškaraca (55,8 godina muškarci, 59,63 godine žene) [9], kao i Baican i saradnici kod pacijenata sa PV u severozapadnom delu Rumunije (muškarci 49, žene 55,3 godine) [10]. U Makedoniji, mediteranskom delu Turske i na Siciliji, zabeležen je niži uzrast oboljevanja kod žena [4, 11, 26]. U Turskoj je prosečan uzrast oboljevanja za žene iznosio 40, za muškarce 46 godina [11], u Makedoniji 51 godina za žene i 53 za muškarce [4], na Siciliji 53 godina za žene i 57 godina za muškarce [26]. Prosečna starost pacijenata na početku bolesti od PV u Turskoj je niža nego u drugim mediteranskim zemljama (43 godine) i sličnija je prosečnoj starosti oboljevanja naših pacijenata romske etničke pripadnosti [11]. U našem istraživanju, uporedili smo i prosečnu starost pacijenata na početku bolesti sa različitim podtipovima pemfigusa odnosno PM i MCP. Prosečna starost oboljevanja kod oba podtipa pemfigusa bila je slična: 53,9 PM i 53,5 godina MCP što je i razumljivo budući da su i PM i MCP kliničke varijante (podtipovi) pemfigus vulgarisa. Najmlađi pacijent u vreme početka bolesti (uzrast 20 godina) bio je pacijent romske etničke pripadnosti. Najstarija pacijentkinja obolela od PV u ovom istraživanju imala je 88 godina. Najstariji zabeleženi pacijenti u svetu u vreme nastanka PV su imali 92 [18], 93 [28] i 95 godina [23].

Klinički podtipovi PV koji su bili zastupljeni su MCP kod 64 (88,9%) a ostatak su činili pacijenti sa PM. Zastupljenost MCP kod naših pacijenata je slična kao i u drugim publikovanim serijama [3, 4, 8].

Iako je dokazana genetska predispozicija za razvoj oboljenja i udruženost sa HLA genima, opisuje se mali broj familijarnog pemfigusa [155]. Pojava PV unutar članova porodice nije česta, uglavnom su zabeleženi slučajevi kod srodnika I i II kolena (roditelj - dete, braća ili sestre) [37, 216-218]. Kricheli i saradnici su do 2000. godine naveli svega 27 zabeleženih familijarnih pemfigusa [156]. Pretpostavlja se da je bitna uloga faktora spoljašnje sredine kao i genetski lokusi izvan HLA, budući da pojedini članovi porodice sa identičnim HLA haplotipovima kao i oboleli članovi i sa prisutnim pemfigusnim antitelima neće razviti pemfigus [155, 156, 216]. U našoj studiji, familijarna zastupljenost PV zabeležena je kod 4 pacijenta (5,6%), dva pacijenta bila su rođeni brat i sestra, oboje uključeni u istraživanje a dvoje drugih pacijenata su imali jednog od roditelja sa pemfigusom u jednom slučaju a u drugom slučaju tetku, koji nisu bili uključeni u ovo istraživanje.

U studiji je za procenu stepena aktivnosti pemfigusa kod ispitanika korišćen je PDAI, budući da su dva najčešće prihvaćena sistema procene stepena aktivnosti bolesti PDAI i ABSIS [176-178], a pokazana je bolja pouzdanost PDAI [179]. Kod pacijenata smo koristili i PAAS kao jedan od prvih sistema za ocenu aktivnosti bolesti [175], i pokazali jasan i visok stepen korelacije ova dva sistema ocenjivanja. PAAS sistem ocenjivanja se poslednjih godina malo koristi jer su pojedini autori ukazivali na nedostatke PAAS odnosno slabiju korelaciju sa stvarnim stepenom aktivnosti bolesti [176]. Zbog toga je stepen aktivnosti bolesti izražen PDAI skorom je korišćen za sve korelacije u ovom istraživanju.

Teže kliničke slike bile su prisutne kod pacijenata romske etničke pripadnosti (prosečan PDAI $52,6 \pm SD 17,53$) u odnosu na Srbe (prosečan PDAI $28,09 \pm SD 22,93$). S obzirom na povećanu incidenciju i teže kliničke forme PV kod pojedinih etničkih pripadnosti i na određenim podnebljima [2, 6, 9-11], kao i na osnovu dosadašnjeg kliničkog iskustva sa pacijentima romske populacije obolelim od PV, ovakvi rezultati su očekivani.

Iako je maksimalna vrednost PDAI skora 263, kod naših ispitanika maksimalna vrednost je iznosila 83 što predstavlja 31,6% referentne maksimalne vrednosti. Slične vrednosti su imali i Rosenbach i saradnici u seriji od 15 pacijenata sa PV [179]. Niže vrednosti stepena aktivnosti bolesti u našem istraživanju, pored subjektivnosti procene lekara, posledica su i činjenice da je određeni broj ispitanika bio u kliničkoj odnosno potpunoj remisiji, a stepen aktivnosti bolesti je računat u vreme testiranja za svakog pacijenta.

Kod svih pacijenata bila je zahvaćena najmanje jedna vidljiva sluzokoža, i to oralna, što je i najčešći slučaj kod pacijenata sa PV [2, 5].

Terapijski pristup je bio dosta varijabilan, zavisio je od težine kliničke slike i terapijskog odgovora. Najveći broj pacijenata (54,2%) lečen je jednim terapijskim modalitetom. Kod većeg broja pacijenata sa MCP je bilo potrebno sprovesti 2 ili 3 terapijska modaliteta u odnosu na pacijente sa PM. Na osnovu dosadašnjeg iskustva i praćenja pacijenata obuhvaćenih istraživanjem, rezultat varijabilnog terapijskog odgovora i potrebe za novim terapijskim pristupom češće je bio posledica neadekvatne komplijanse nego same rezistencije oboljenja. Izuzetak je pacijent sa MCP kod koga su u cilju stabilizacije bolesti bila sprovedena čak 4 terapijska modaliteta. Zabeležene komplikacije kako samog oboljenja tako i kao posledica terapije, slična su sa rezultatima drugih autora [2, 23, 162, 186, 189-191, 193].

Ispitivanje udruženosti HLA kroz analize polimorfizma HLA i neravnoteže udruživanja alela, kao i razlike učestalosti alela i haplotipova HLA među populacijama, značajne su za razumevanje etiopatogeneze različitih oboljenja [39, 41]. Do sada je već više puta potvrđena udruženost polimorfizma HLA i pemfigusa u različitim populacijama. Ovim istraživanjem hteli smo da prikazemo učestalost alela i alelskih grupa kod pacijenata sa pemfigusom na teritoriji Srbije. U cilju ispitivanja kvaliteta izvršene tipizacije alela u HLA lokusu određivana je Hardy-Weinberg-ova ravnoteža ispitivanih genotipova. Rezultati ovog testiranja pokazali su da je broj pacijenata, kao i broj zdravih osoba, odnosno kontrola, bio dovoljan za adekvatnu analizu i interpretaciju dobijenih rezultata.

Tipizacijom HLA-DRB1 lokusa reagensima niske rezolucije među pacijentima sa PV uključenim u ovu studiju pokazana je značajno viša učestalost DRB1*04 i DRB1*14 alelskih grupa kod obolelih u odnosu na zdravu populaciju. Značajno je bila manja učestalost DRB1*11 alelske grupe kod pacijenata nego kod kontrola ukazujući na eventualno postojanje protektivnih alela u ovoj alelskoj grupi. Naši rezultati su očekivani s obzirom da je do sada više puta potvrđena udruženost DRB1*04 i DRB1*14 alelske grupe i pemfigusa. Povećana učestalost DRB1*04 alelske grupe zabeležena je u više populacija. U Evropi, povećana učestalost DRB1*04 zabeležena je u Slovačkoj [59], Engleskoj za pacijente kako evropskog tako i azijskog porekla [58], južnom delu Italije [56] i Nemačkoj [211]. Pored evropskih zemalja, povećana učestalost DRB1*04 alelske grupe zabeležena je i u Egiptu [211], Iranu [51], Maroku [214], Venecueli [207]. Kod koreanskih pacijenata, iako je 8/15 pacijenata bio nosilac datog alela nije bilo značajne razlike u odnosu na zdravu populaciju [203]

najverovatnije zbog malog uzorka. Povećana učestalost DRB*14 alelske grupe zabeležena je u južnom delu Italije, [56], Slovačkoj [59], Velikoj Britaniji [58], Turskoj [53, 213] i Nemačkoj [211]. Pored evropskih zemalja, udruženost DRB1*14 alelske grupe i PV zabeležena je i u Egiptu [211], u Maroku [214], u Siriji [210], Venecueli [207] i u serevoistočnom delu Kine [219]. Nasuprot dosadašnjim rezultatima u drugim populacijama, kod koreanskih pacijenata sa PV (a ni sa PF) nije bilo ni jednog pacijenta nosilaca DRB1*14 alelske grupe [203] što bez obzira na mali broj uzoraka može da ukaže na specifičnost korejske populacije.

Tipizacijom HLA-DQB1 lokusa reagensima niske rezolucije kod pacijenata sa PV u ovom istraživanju nisu zabeležene značajne razlike u učestalosti bilo koje DQB1* alelske grupe. Učestalost DQB1*02 alelske grupe bila je niža u odnosu na zdravu populaciju ali se značajnost izgubila nakon korekcije. Ipak, nizak OŠ od 0,444 je eventualno ukazivao na protektivnu ulogu ove alelske grupe. Slično našim rezultatima, u Turskoj i Venecueli takođe nisu zabeležene značajne razlike u učestalosti DQB1*03 i *05 alelskih grupa [53, 207]. Za razliku od naših rezultata testiranja u niskoj rezoluciji, povećana učestalost DQB1*03 i DQB1*05 alela kod pacijenata sa PV više puta je potvrđena. Zabeležena je visoka učestalost DQB1*05 kod pacijenata u južnom delu Turske [213] i slovačkih pacijenata [59] kao i DQB1*03 kod slovačkih [59] i marokanskih pacijenata [214].

U sledećem koraku rađena je tipizacija lokusa DRB1* i DQB1* testovima visoke rezolucije u cilju utvrđivanja alela udruženih ili ne sa pemfigusom. Tipizacijom DRB1*04 alelske grupe, pokazana je visoka učestalost DRB1*04:02 alela. Izračunati OŠ za nosioce ovog alela iznosio je 15,469. Tipizacija DRB1*14 takođe je pokazala visoku učestalost DRB1*14:04, (13,2%), ali OŠ je ostao nedefinisan zbog odsustva ovog alela u zdravoj populaciji Srbije [42]. Iako je učestalost DRB1*14:54 takođe bila visoka (13,2%) statistička značajnost se izgubila nakon korekcije. Ipak, postojao je visok OŠ za DRB1*14:54, 2,685, uz IP preko 1, što bi ga moglo svrstati u alele od rizika za nastanak oboljenja kod naših pacijenata. Niska učestalost zabeležena je za DRB1*03:01, *16:01, *01:01, i *13:02. Nakon korekcije, nivo statističke značajnosti nije dostignut iako bi se na osnovu niskih OŠ vrednosti svi navedeni alele mogli svrstati u protektivne.

Učestalost DRB1*04:02 alela kod naših pacijenata slična je kao i u drugim evropskim zemljama, sa izuzetkom Sardinije i Španije gde je učestalost bila viša. U evropskim populacijama, učestalost HLA-DRB1*04:02 alela opisana je kod čak oko 80% pacijenata sa

Sardinije [50] i iz Španije, [208], dok je učestalost ovog alela među pacijentima u Francuskoj [72], Italiji, [56], i Slovačkoj [59] slična kao u Srbiji. U studiji Haasea i saradnika, tipizacija je rađena za 3 grupe cifara (DRB1*04:02:01), učestalost ovog alela kod nemačkih pacijenata bila je visoka, 71,4% [211]. Veoma visoka učestalost DRB1*04:02 opisana sa kod obolelih od PV među Aškenazi Jevrejima, [37, 220], Irancima, [221], Sirijcima [210] i Egipćanima, (DRB1*04:02:01) [211] a niža ali ipak statistički značajno viša u odnosu na etničke kontrole među pacijentima španskog porekla u Venecueli [207] i Argentincima [209]. Na osnovu dosadašnjih rezultata uočava se da je učestalost DRB1*04:02 alela značajno viša kod obolelih budući da se prevalencija ovog alela u zdravoj populaciji u opisanim studijama kretala od 0,5-4%, a kod Aškenazi Jevreja i do 8% [222]. U našoj zdravoj populaciji učestalost DRB1*04:02 alela iznosila je 2,7% [42]. Najviši odnos šansi, odnosno relativni rizik kod nosilaca DRB1*04:02 alela zabeležen je kod pacijenata sa PV na Sardiniji, RR 127,11 [50] i u Španiji, OŠ 100,8 [208]. Kod naših pacijenata, OŠ (15,469) je bio sličan pacijentima azijskog porekla u Velikoj Britaniji (OŠ 19,1) [58], pacijentima u Argentini (RR 18, 23) [209] i Siriji (OŠ 13,9) [210], a manji u odnosu na slovačke [59], brazilske [212], italijanske pacijente [50], pacijente u SAD (nejevrejska populacija) [52] i Venecueli [207] a viši nego kod Iranskih pacijenata (RR 7,16) [51]. Drugi DRB1*04 aleli za koje je zabeležena udruženost sa PV su DRB1*04:04 kod slovačkih pacijenata [59], DRB1*04:03 [57] i DRB1*04:06 kod japanskih [57, 205]. DRB1*04:04 je kod naših pacijenata zabeležen samo kod jednog pacijenta. DRB1*04:03 i *04:04 bili su niske učestalosti i kod pacijenata i u zdravoj srpskoj populaciji [42]. Kod francuskih pacijenata sa PV takođe nije bilo značajne učestalosti DRB1*04:04 alela, ali je postojala udruženost sa PF (17,5%, RR 4,1) [72]. U seriji od devet japanskih pacijenata sa PV, 5/9 pacijenata bili su nosioci DRB1*04:03 ili DRB1*04:06 alela [205]. HLA-DRB1*04:06, za koga je pokazana jasna udruženost sa PV kod Japanaca, se od DRB1*04:02 (udruženog sa pemfigusom u mnogim populacijama) razlikuje u P4 i P7 žljebovima (P1, P6 i P9 žljebovi su isti kod oba alela), sadrži pozitivno naelektrisane aminokiseline (arginin na poziciji 71) i ne zna se tačan mehanizam udruženosti sa PV, budući da je zbog pozitivno naelektrisanih aminokiselina, malo verovatno da može da vezuje pozitivno naelektrisane Dsg peptide [60, 72]. Kada je u pitanju DRB1*04:06 (kao i *04:01 ili *04:03), pretpostavlja se da, kao što je ranije navedeno, i drugi peptidi mogu učestvovati u inicijaciji autoimunskog odgovora ili su pak drugi delovi HLA-DRβ1 lanca ključni u predispoziciji za razvoj oboljenja, a svakako dalja istraživanja alel-specifičnih T ćelijskih klonova mogla bi da razjasne mehanizam. Hertl i saradnici su pokazali prezentaciju peptida i pomoću HLA molekula koji nisu udruženi sa PV [61].

Udruženost DRB1*14:04 sa pemfigusom takođe se opisuje u većini dosadašnjih studija, sa različitom učestalošću u zavisnosti od ispitivane populacije. Učestalija pojava ovog alela kod pacijenata sa PV je zabeležena kod pacijenata u Aziji. Delgado i saradnici su kod pacijenata sa PV u Indiji [54] i Pakistanu [204] ukazali na značajno povećanu učestalost ovog alela. U Engleskoj, Saha i saradnici su takođe pokazali udruženost DRB1*14:04 alelom sa PV i kod pacijenata evropskog kao i kod onih koji su azijskog porekla [58]. I u mediteranskim zemljama zabeležena je udruženost ovog alela sa PV kao npr. u Francuskoj [72] i među Italijanima 16,3% [56]. Slično srpskoj populaciji, i u zdravoj populaciji Slovačke i Velike Britanije (evropsko poreklo) zabeleženo je odsustvo DRB1*14:04 alela [58, 59], dok je u zdravoj populaciji Indusa, učestalost ovog alela iznosila 13,5% [54] a u Pakistanu čak 23,1% [204]. Sličnost distribucije patogenih alela kod različitih populacija mogla bi se objasniti teorijom da se nastanak PV vezuje za indijsko područje a da se potom širi na područja srednjeg Istoka a zatim i Evropu, uglavnom zahvatajući centralnu, južnu i mediteranski deo [54]. Zbog verovatnog uplitanja različitih populacija tokom vremena, sličnost genetske distribucije određenih alela u različitim narodima je razumljiva. Mobini i saradnici su ukazali na sličnost iranskih pacijenata i Aškenazi Jevreja navodeći uticaj persijske vladavine nad nekadašnjom Palestinom i Jevrejima [221].

Do sada opisivanu udruženost DRB1*14:01 alela i PV nismo potvrdili među našim pacijentima; alel je bio niske učestalosti i kod pacijenata i kod zdrave populacije, ali skoro podjednako zastupljen (4,2% kod pacijenata i 3,1% kod zdrave populacije) [42]. Slične rezultate su pokazali Saha i saradnici kod pacijenata sa PV u Velikoj Britaniji [58], i Parnička i saradnici kod slovačkih pacijenata [59]. U slovačkoj grupi pacijenata, DRB1*14:01 čak nije zabeležen ni kod jednog pacijenta, a i u kontrolnoj grupi je bio niske učestalosti, 0,44% [59]. Kod pacijenata sa PV u ostalim evropskim zemljama učestalost DRB1*14:01 alela se kretala od 13,4% (OŠ 8,8) u Španiji [208], 13,5% u Francuskoj (RR 3,1) [72], 15,62% na Sardiniji (RR 9,88) [50], a najviši relativni rizik nastanka bolesti kod nosilaca DRB1*14:01 alela u evropskim zemljama bio je zabeležen je kod italijanskih pacijenata, RR 23,62 [50]. U ostalim geografskim područjima, kod drugih etničkih populacija, statistički značajna učestalost DRB1*14:01 alela zabeležena je kod Iranaca, [51], kao i kod pacijenata sa PV nejevrejske etničke pripadnosti u Sjedinjenim Američkim Državama [52, 204], kod pacijenata u Venecueli španskog porekla [207] i kod onih u Argentini, [209]. Identifikacija DRB1*14:01 alela je prethodila identifikaciji DRB1*14:04, koji je verovatno nastao genskom konverzijom ili mutacijom dve aminokiseline na DRB1 genu (na poziciji 14 i 17) koje nisu uključene u

prezentaciju antigena [54]. Haase i saradnici su i kod nemačkih i egipatskih pacijenata zabeležili udruženost DRB1*14:01:01 (tipizacija rađena za 3 grupe cifara) sa PV [211]. Rezultati su prikazani zbirno za DRB1*14:01 i DRB1*14:54, verovatno usled toga što metodama tipizacije koji su korišćeni u njihovom istraživanju nisu mogli jasno da razdvoje ova 2 alela [211].

Poslednjih godina opisuje se udruženost DRB1*14:54 sa PV [58, 59]. Do sada je retko opisivana udruženost DRB1*14:54 alela sa PV najverovatnije zbog činjenice da je do 2005, ovaj alel bio uvršćen u DRB1*14:01 (zbog razlike u samo jednoj bazi unutar egzona 3) i tadašnjim metodama tipizacije nije bilo moguće razlikovanje ova dva alela [59]. U stvari, DRB1*14:01 se od DRB1*14:54 razlikuje na poziciji 51 na egzonu 3, čime se menja triplet TAC u CAC dovodeći do promene aminokiseline tirozin u histidin na poziciji 112 u DRB1 lancu [58]. U našoj seriji, tipizacija je rađena SSP testovima kojima je moguće razlikovati DRB1*14:01 i DRB1*14:54 (AllSet+TM Gold SSP Typing Kits, Invitrogen) a sekvenciranje nije rađeno tako da nije moguće predviđanje alela na nivou šest cifara. Isto tako, u cilju dobijanja adekvatnih rezultata, a budući da razlika ova dva alela nije na peptid vezujućem mestu, urađena su poređenja i za oba alela zbirno za oba alela (DRB1*14:01 i DRB1*14:54) sa sabranim zdravim kontrolama za oba alela. Zabeležene su značajne razlike, ali nakon korekcije, statističke značajnosti nije bilo ($p=0,0049$, $p_{adj}=0,133$). Kod naših pacijenata postojala je viša učestalost DRB1*14:54, ali se značajnost izgubila nakon korekcije. Ipak, zbog visokog OŠ i IP preko 1, svakako ga možemo uvrstiti u eventualne alele od rizika kod naših pacijenata. Udruženost ovog alela opisana je kod pacijenata evropskog porekla u Engleskoj [58] i kod pacijenata u Slovačkoj [59].

Testovima visoke rezolucije, sem gore opisanih, nije bilo drugih učestalijih alela u grupi naših pacijenata. Ostali DRB1* aleli i alelske grupe udružene sa PV opisivane kod različitih populacija su DRB1*01 kod koreanskih pacijenata (9/15 pacijenata) [203]. Kod koreanskih pacijenata, pokazana je i viša učestalost DRB1*06:07 alela ali nakon korekcije, ova razlika nije dostigla statističku značajnost mada je RR bio visok (11,8) [203]. Kod Japanaca, pored ranije navedenih, zabeleženi udruženi aleli sa PV bili su i DRB1*14:05,*14:06, *14:08 i *08:02 [49, 57, 205, 223]. Kod italijanskih pacijenata opisana je i udruženost PV sa DRB1*08:04 [50]. Učestalost DRB1*08:04 je potom opisana i kod egipatskih pacijenata (tipizacija rađena za 3 grupe cifara, DRB1*08:04:01) [211] i pacijenata u Brazilu [212]. U našoj seriji, nije uopšte zabeležen DRB1*08:04 alel kod pacijenata ni kod zdrave populacije [42]. Nalaz udruženosti DRB1*08:04 kod pacijenata sa PV je prilično zanimljiv budući da

dati alel nije u LD sa nekim od alela udruženih sa oboljenjem [211]. Isto tako, udruženost ostalih opisanih alela i PV kod Japanaca, Koreanaca i Kineza razlikuje se od ostalih populacija; što ukazuje verovatno na genetsku specifičnost, odnosno na već postavljene pretpostavke o ulozi multiplih alela u predispoziciji oboljenja [203].

Tipizacija testovima visoke rezolucije rađena je i za DQB1*alelsku grupu u kojoj prethodno testovima niske rezolucije nismo uočili udruženost neke od DQB1* alelske grupe i PV. Zabeležili smo značajno višu učestalost DQB1*03:02 alela, i DQB1*05:03. Aleli niske učestalosti bili su DQB1*03:01, *02:01 i *06:04, ali sa gubitkom značajnosti nakon korekcije, sa niskim OŠ i mogućim protektivnim efektom.

Naši rezultati su u skladu sa dosadašnjim. Udruženost DQB1*03:02 alela i PV zabeležena je kod velikog broja populacija. U Evropi zabeležena je kod pacijenata na Sardiniji i u Italiji [50, 56], u Španiji [208], Francuskoj [72], u Slovačkoj [59] i kod pacijenata evropskog porekla u Velikoj Britaniji [58]. U ostalim populacijama, povećana učestalost DQB1*03:02 alela zabeležena je u nejevrejskoj populaciji pacijenata u SAD [52], kod Iranaca [51] i Argentinaca [52, 209]. Kod pacijenata u Indiji, Pakistanu, Venezueli i Koreji nije bilo razlika u učestalosti ovog alela, odnosno nije pokazana njegova udruženost sa PV [54, 203, 204, 207].

Udruženost DQB1*05:03 i PV takođe je opisana u većini studija kod pacijenata sa PV, različitih etničkih pripadnosti i na različitim geografskim područjima [52, 54, 56, 58, 59, 72, 204, 208]. Najveća učestalost DQB1*05:03 zabeležena je u Italiji, u južnom delu, 62,2% [56]. U ostalim evropskim zemljama zabeležena je udruženost DQB1*05:03 i PV; u Velikoj Britaniji, gde je zabeležena viša učestalost kod pacijenata indoazijskog nego engleskog porekla [58], u Francuskoj [72], u Španiji [208], u Slovačkoj [59], na Sardiniji [50]. U ostalim populacijama, udruženost DQB1*05:03 zabeležena je u Sjedinjenim američkim državama, i kod pacijenata nejevrejske pripadnosti i kod Aškenazi Jevreja [52], Argentinici [52, 209], u azijskim zemljama, kao što su Pakistan [204] i Indija, [54]. Interesantno je da za razliku od Indije i Pakistana, u Iranu nije zabeležena udruženost DQB1*05:03 alela i PV [51]. Shams i saradnici su kod iranskih pacijenata sa PV našli udruženost sa DQB1*05:02 alelom (18,25%, RR 3,5), što nije zabeleženo u drugim populacijama [51]. U Italiji [56], Slovačkoj [59], Pakistanu [204] i Koreji [203] učestalost DQB1*05:02 nije bila statistički značajno različita u odnosu na učestalost ovog alela kod etničkih kontrola. U našoj seriji takođe je bila niska učestalost DQB1*05:02 (6,9%) ali bez statističkog značaja.

Uopšte, do danas su populacione studije pokazale različitu distribuciju alela u različitim etničkim grupama. Do sada, najčešće zabeležena udruženost sa PV bila je sa DRB1*14:01 i DRB1*04:02 alelima [37, 48-52, 54, 56, 97]. Pored najčešće opisanih DQB1* alela-DQB1*03:02 i *05:03 kod PV [51, 52, 54, 56, 72, 209], opisana je udruženost i sa DQB1*05:02 [51] i DQB1*03:01 alelom sa PV [224]. Zbog mogućnosti prezentacije antigenih peptida, smatra se da su DRB1*04:02 i DQB1*05:03 zapravo pravi patogeni aleli. Zbog LD sa patogenim alelima, ostali učestaliji aleli ne smatraju se pravim *disease-conferring* alelima.

Kao što su pokazani različiti aleli i alelske grupe udružene sa oboljenjem, do sada je u različitim istraživanjima opisano i nekoliko alelskih grupa odnosno alela koji su u negativnoj korelaciji sa PV, odnosno predstavljaju tzv. protektivne alele.

Kod naših pacijenata, kao što je ranije navedeno, pokazali smo nisku učestalost DRB1*11 alelske grupe. Blizu nivoa značajnosti bile su i DRB1*03 ($p_{adj}=0,053$) i DRB1*15 ($p_{adj}=0,053$), takođe sa niskim OŠ. Slično niska učestalost DRB1* 11 zabeležena je kod iranskih [51], turskih (južni deo Turske) [213] i sirijskih pacijenata [210]. Niska učestalost DRB1*03 zabeležena je kod sirijskih pacijenata [210] i pacijenata u Venecueli [207]. Ostale zabeležene DRB1 alelske grupe bile su kod slovačkih pacijenata DRB1*07 i DRB1*13 [59], kod Aškenazi Jevreja DRB1*07 [52], DRB1*07 i DRB1*15 kod Iranaca [51]. Kod marokanskih pacijenata DRB1*15 [214], kao i kod pacijenata u Velikoj Britaniji [58] u odnosu na njihove etničke kontrole.

Testovima visoke rezolucije u našem istraživanju pokazali smo da su DRB1*03:01, *16:01, *01:01 i *13:02 bili ređi nego kod kontrola ali nakon korekcije nivo značajnosti nije dostignut. Ipak, nizak OŠ bi verovatno mogao da ih svrsta u protektivne alele. DRB1* aleli koji su opisani sa značajno manjom učestalošću kod pacijenata su DRB1*03:01 kod Italijana i obolelih na Sardiniji [50], Aškenazi Jevreja [52], Iranaca [51], i pacijenata u Velikoj Britaniji [58]. DRB1*04:03 je bio protektivan kod Sirijaca [210] a DRB1*11:04 kod Aškenazi Jevreja [52].

Kao što je već napomenuto, nije bilo razlike u učestalosti DQB1 alelskih grupa, a ni alela sa niskom učestalošću od statističkog značaja. Za DQB1*02 alelsku grupu, značajnost se izgubila nakon korekcije. Slično je i za DQB1*03:01, *02:01 i *06:04 alele. Na DQB1 lokusu, opisane alelske grupe kod pacijenata sa PV, sa eventualnom protektivnom ulogom su

DQB1*02 kod Turaka [213], Francuza [72], i u Velikoj Britaniji [58]. DQB1*06 je bio protektivan u Turskoj [213], Slovačkoj [59] i Maroku [214]. Slično našim, kod indijskih pacijenata sa PV učestalost DQB1*02 alelske grupe je bila niska, sa gubitkom statističke značajnosti nakon korekcije [54]. Zabeleženi eventualno protektivni aleli na DQB1 lokusu su DQB1*02:01 na Sardiniji i u centralnoj Italiji [50], u Iranu [51], kod Aškenazi Jevreja [52]. DQB1*03:01 je bio protektivan u Venecueli [207], u Americi kod Aškenazi Jevreja [52], Iranu, gde su takođe opisani i DQB1*06:02 i DQB1*06:11 [51]. DQB1*05:02 je bio protektivan kod Slovaka [59]. U Velikoj Britaniji, zabeležena je niska učestalost DQB1*06:02 kod pacijenata evropskog porekla i DQB1*06:01 kod pacijenata azijskog porekla ali se statistička značajnost u obe grupe izgubila nakon korekcije [58]. Kod koreanskih pacijenata, DQB1*03:01 i *06:04 nisu čak ni zabeleženi kod pacijenata sa PV, ali nivo značajnosti nije dostignut [203].

Dalje, u istraživanju smo izračunali i dvoalelske haplotipove i njihovu učestalost kod pacijenata. U našoj grupi pacijenata, zabeležena je viša učestalost DRB1*04-DQB1*03 haplotipa (31,3%, OŠ 4,09) i DRB1*14-DQB1*05 haplotipa (30,6%, OŠ 6,135). Od haplotipova koji su značajno manje bili zastupljeni kod pacijenata, ukazujući eventualno na protektivne haplotipove bili su DRB1*11-DQB1*03, DRB1*01-DQB1*05, i DRB1*03-DQB1*02.

Nema mnogo istraživanja u kojima su analizirane učestalosti haplotipova kod obolelih bilo testovima niske ili visoke rezolucije. Učestalost DRB1*14-DQB1*05 i DRB1*04-DQB1*03 haplotipova statistički je znatno viša kod naših pacijenata sa pemfigusom nego kod kontrola, a rizik razvoja oboljenja bio je viši za nosioce DRB1*14-DQB1*05 haplotipa u odnosu na DRB1*04-DQB1*03 haplotip. Značajno veća učestalost ovih haplotipova zabeležena je i kod pacijenata u Turskoj [53]. U ovom istraživanju, učestalost haplotipova u niskoj rezoluciji, bilo DRB1*04 ili DQB1*05 na jednom haplotipu, iznosila je 73,1%; 28/72 pacijenata su bili nosioci i DRB1*04 i DQB1*05 alelske grupe, 26/72 su bili nosioci DQB1*05 ili 16/72 DRB1*04 alelske grupe. Dva pacijenta nisu bila nosioci nijednog od patogenih alela (jedan pacijent je bio nosilac DRB1*11-DQB1*03 genotipa, homozigot, i drugi takođe homozigot, DRB1*13-DQB1*06, genotip).

Testovima visoke rezolucije, najučestaliji haplotipovi kod naših pacijenata bili su DRB1*04:02-DQB1*03:02, 29,9% OŠ 15,047 i DRB1*14:04-DQB1*05:03, 11,1% sa nedefinisanim OŠ zbog odsustva haplotipa u zdravoj populaciji Srbije [42]. Shodno našim

prethodno komentarisanim rezultatima i učestalost DRB1*14:54-DQB1*05:03 je bila viša kod obolelih (11,1%) ali se značajnost izgubila nakon korekcije ali ga visok OŠ 2,449, svrstava u haplotip od rizika. Haplotiovi sa manjom učestalošću bili su DRB1*03:01-DQB1*02:01, DRB1*16:01-DQB1*05:02, DRB1*01:01-DQB1*05:01, DRB1*13:02-DQB1*06:04, ali ni za jedan od pomenutih haplotipova nakon korekcije značajnost nije dostignuta mada bi nizak OŠ mogao da ih svrsta u eventualne protektivne haplotipove. U Slovačkoj, najčešći haplotipovi bili su HLA-DRB1*04:02-DQB1*03:02 i DRB1*14:54-DQB1*05:03 [59]. Navodi se čak da postoje samo 2 haplotipa kod evropskih pacijenata koji su udruženi sa PV - gore navedeni DRB1*04:02-DQB1*03:02 haplotip i drugi - HLA-DRB1*14:01-DQB1*05:03 kao deo HLA-**DRB1*14:01-DQA1*01:01-DQB1*05:03** haplotipa [221]. Mobini i saradnici je i kod 20 iranskih pacijenata pokazali da skoro svi imaju iste haplotipove – HLA-DRB1*04:02-DQB1*03:02 unutar HLA-**DRB1*04:02-DQA1*03-DQB1*03:02** (karakterističnog i za Aškenazi Jevreje) [221]. U nejevrejskoj populaciji Amerike, učestalost DRB1*14:01-DQB1*05:03 haplotipa iznosila je 17,14% bez podataka o RR [52], u Venecueli 8,2% sa RR 41,58 uz odsustvo haplotipa kod zdravih kontrola [207].

Dva naša prethodno opisana pacijenta bili su nosioci DRB1*13:01-DQB1*03:01 genotipa (homozigot) i DRB1*11:01/*11:03-DQB1*03:01/*03:01 genotipa. Povremeno, pojedini autori objavljuju slične rezultate HLA tipizacije. U studiji Zakka i saradnika, jedan pacijent sa PV nije bio nosilac alela udruženog sa PV već je bio nosilac alela udruženih sa buloznim pemfigoidom (BP) - DQB1*03:01 i DQB1*06:02 [224]. Veldman i saradnici su u svom istraživanju zabeležili 3/16 pacijenata sa PV bez patogenog alela u makar jednom haplotipu (2 pacijenta bez patogenog alela, nosioci DQB1*03:01 alela (DRB1*04:01/*13:03-DQB1*03:01), treći DRB1*07:01-DQB1*03:03 [225]. Udruženost patogenih alela karakterističnih za obe autoimunske bulozne dermatoze (i PV i BP) kod pacijenata obolelih od jednog ili drugog oboljenja više puta je opisana [54, 61, 204, 205, 207, 226]. Iako su Miyagawa i saradnici ukazali na sličnost DQB1*03:01 i DQB1*05:03 [205], Lee i saradnici su naveli da se ipak ova dva alela razlikuju u više pozicija unutar žljeba, čak i ukazali na smanjenu učestalost DQB1*03:01 alela kod obolelih (Aškenazi Jevreji) odbacujući potencijalnu patogenu ulogu ovog alela kod PV [52]. Delgado i saradnici su kod pacijenata sa PV opisali dva pacijenta koja nisu posedovala patogeni alel, 1 je bio nosilac DRB1*15:01/*11:01-DQB1*06:02/*03:01 a drugi DRB1*15:01/*08:04-DQB1*06:03/*05:01 genotipa [204]. Budući da je DRB1*08:04 alel udružen sa PV i sa verovatnom mogućnošću prezentovanja Dsg3 peptida, izgleda da je u studiji Delgada i saradnika samo jedan pacijent

nije bio nosilac nekog opisanog patogenog alela [50, 211]. Od 20 iranskih pacijenata sa PV, Mobinijeva i saradnici su kod jednog pacijenta imali genotip bez patogenog alela (DRB1*04:03-DQB1*03:01/DRB1*11-DQB1*03:01) [221]. Postojanje alela odnosno haplotipova kod obolelih od PV sa do sada pokazanom negativnom korelacijom još jednom potvrđuje dosadašnje pretpostavke postojanja dodatnih gena i druge moguće patogenetske mehanizame nastanka oboljenja [61].

Kada se raspravlja o protektivnim haplotipovima kod naših pacijenata, protektivnim bi se mogli smatrati DRB1*03-DQB1*02, DRB1*01-DQB1*05, i DRB1*11-DQB1*03. Odnos šansi je za sva 3 haplotipa bio manji od 0,4. U visokoj rezoluciji, nijedan od haplotipova sa niskom učestalošću kod pacijenata nije bio statistički značajno ređi nego kod kontrola. DRB1*16:01-DQB1*05:02, DRB1*01:01-DQB1*05:01 i DRB1*13:02-DQB1*06:04 bili su niske učestalosti (4,2, 2,1 i 0,7%), ali nakon korekcije, nije dostignut nivo značajnosti. Za sva ova 3 haplotipa, odnos šansi je takođe bio niži od 0,4. Od haplotipova sa smanjenom učestalošću kod pacijenata u Iranu, zabeleženi su DRB1*15-DQB1*06:11 unutar **DRB1*15-DQA1*01:03-DQB1*06:11**; DRB1*03:01-DQB1*02:01 unutar **DRB1*03:01-DQA1*05:011-DQB1*02:01**; DRB1*07-DQB1*02:01 unutar **DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:01** i DRB1*11-DQB1*03:11 unutar **DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03:11** haplotipa [51]. U drugoj studiji sa iranskim pacijentima sa PV, Mobini i saradnici su zabeležili značajno manju učestalost DRB1*11/*15-DQB1*03:01/*06:02 genotipa kod svojih pacijenata [221]. Tunca i saradnici, kao ni Parnička i saradnici nisu opisali eventualne protektivne haplotipove kod svojih pacijenata [53, 59].

Kod naših pacijenata, izračunali smo učestalost troalelskih haplotipova. Najučestaliji su bili DRB1*04:02-DQA1*03:01-DQB1*03:02, 25%, DRB1*14:54-DQA1*01:04-DQB1*05:03, 9,7% i DRB1*14:04-DQA1*01:04-DQB1*05:03, 8,3%, što je razumljivo budući da smo već pokazali povećanu učestalost dvoalelskih haplotipova. Dalja poređenja nisu bila moguća.

Različiti stepeni neravnoteže udruživanja alela se koriste u cilju određivanja najznačajnijih alela koji su ili učestaliji ili najmanje zastupljeni, a zbog povezanosti sa ključnim alelom za razvoj PV [45, 52]. Upravo zbog LD, većina pacijenata sa DRB1*04 su nosioci i DQB1*03:02. Isto tako, većina sa DRB1*14 imaju DQB1*05:03. Shodno tome, aleli DRB1*04:02, *04:03 i *04:04 su takođe u LD sa DQB1*03:02, a DRB1*14 (*14:01, *14:54, *14:04 i *14:05) u LD sa DQB1*05:03. Zbog naglašenog LD na DR-DQ lokusima, malo je verovatno da je povećana učestalost pojedinih alela odnosno smanjena učestalost drugih

(DR/DQ) odraz jasne povezanosti sa oboljenjem pa je teško tačno definisati koji aleli doprinose podložnosti bolesti [45]. Lee i saradnici su kod pacijenata sa PV u Severnoj Americi pokazali udruženost DRB1*04:02 i DQB1*05:03 alela sa PV i pokazali da je DRB1*04:02 najverovatnije *disease-conferring allele* a da je DQB1*03:02 učestaliji zbog LD sa DRB1*04:02, odnosno da njegova učestalost nije značajna kada se izuzme iz alelskog para sa DRB1*04:02 [52]. Do istog zaključka su došli i Saenz-Cantele i saradnici kod pacijenata sa PV u Venecueli, i čak naglasili da je rizik razvoja bolesti bio viši samo kod pacijenata nosilaca DRB1*04:02, bez obzira da li su ujedno i nosioci DQB1*03:02 [207]. Slično je i sa drugim alelskim parovima - DRB1*04:02-DQA1*03:01 i DQB1*05:03-DRB1*14:01 [52]. I za povećanu učestalost DRB1*14:01 kod pacijenata su zaključili da je posledica LD sa DQB1*05:03, koji je zapravo pravi *disease-conferring* alel [52]. Dalje, Lee i saradnici su, sekvenciranjem aminokiselina u žljebovima DR*04 i DR*14 alela koji nisu udruženi sa PV, ukazali da iako je DRB1*14:01 udružen sa PV u nekoliko etničkih populacija, dati alel sličiji alelima koji nisu udruženi sa PV [52]. Kao i DRB1*04:06, *14:05 i *14:06, i 14:01, prisutne su pozitivno naelektrisane aminokiseline na pozicijama 70 i 71 [52] što onemogućava prezentaciju do sada opisanih imunodominantnih Dsg peptida. Ipak u kontekstu saznanja da za pokretanje autoimunskog pemfigusa i peptidi drugih proteina mogu imati važnu ulogu, značaj pomenutih molekula ostaje da se utvrdi, jer iako možda ne mogu prikazuju opisane imunodominantne Dsg peptide, mogu da prikažu peptide drugih proteina koji bi mogli da budu meta autoantitela.

Analiza stepena neravnoteže alela nije rađena u ovom istraživanju. Na osnovu dobijenih rezultata distribucije, pokazali smo da je sem kod 2 pacijenta (2/144 haplotipa) gde je DQB1*03:02 bio udružen sa drugim alelom DRB1*04 alelske grupe (DRB1*04:03 i *04:04) i jednog pacijenta gde je bio udružen sa DRB1*13:04 alelom, kod svih ostalih pacijenata DQB1*03:02 je bio u paru, tj. LD sa DRB1*04:02, odnosno, i mi možemo zaključiti da je povećana učestalost ovog alela upravo zbog LD sa patogenim DRB1*04:02 alelom. Kod francuskih pacijenata, nosilaca DRB1*04:02 ili DRB1*14:01 alela bilo je 33/37 (svi nosioci DRB1*14:01 bili su i nosioci DQB1*05:03 alela [72]. Isto tako kod pacijenata u Venecueli, nosilaca DRB1*14, svi su bili u LD sa DQB1*05:03 alelom, dok je DQB1*03 bio u LD i sa drugim alelima (koji nisu DRB1*04) [207].

U ovom istraživanju urađena je i tipizacija testovima visoke rezolucije za DQA1 lokus. Dobili učestalost DQA1*01:04, 25,7% i *03:01, 27,1% kod pacijenata sa PV. Poređenje sa zdravom populacijom Srbije nije bilo moguće budući da je nepoznata učestalost DQA1 lokusa. Isto

tako, nema mnogo studija koje su istraživale polimorfizam i DQA1 lokusa i udruženost sa PV. Najčešća statistički značajna zabeležena udruženost PV i DQA1 alela bila je za DQA1*01:04 kod pacijenata u Iranu, Koreji, Italiji i na Sardiniji, Japanu i kod pacijenata u SAD, nejevrejske etničke pripadnosti [50-52, 203, 205]. Povećana učestalost DQA1*03:01 takođe je zabeležena u većem broju istraživanja [50-52, 205]. Učestalost oba DQA1* alela (DQA1*01:04 i *03:01) bila je slična kao kod italijanskih pacijenata [50]. Kod Aškenazi Jevreja i nejevrejske populacije SAD sa pemfigusom, značajno je bila viša učestalost DQA1*05:05 [52]. Od ostalih DQA1* alela udruženih sa PV zabeleženi su DQA1*01:01 u Pakistanu i Indiji [54, 204], *04:01 u Italiji i na Sardiniji [50]. Ovakvi rezultati su svakako razumljivi s obzirom na LD DQA1* sa alelima za koje je dokazana udruženost sa PV-DQA1*01:04-DQB1*05:03, DQA1*03:01-DRB1*04:02, DQA1*05:05-DRB1*04:02, i DQA1*05:05-DQB1*03:02.

Opisani DQA1* aleli niske učestalosti kod pacijenata sa PV bili su DQA1*05:01 kod italijanskih pacijenata i pacijenata na Sardiniji, DQA1*02:01 kod italijanskih pacijenata [50]; kod Iranaca DQA1*05 alelska grupa, DQA1*01:01, *01:03 i *02:01 [51]; u SAD, DQA1*05:01 i kod nejevrejske populacije i Aškenazi Jevreja, kod kojih su opisani i DQA1*01:01, *01:02 i *02:01 [52]. Kod korejskih pacijenata, zabeležena je niska učestalost DQA1*02:01 i *05:01 alela [203]. Kod naših pacijenata, najniža učestalost zabeležena je za DQA1*06:01 i *01:07 (0,7%), *01:05 (3,5%) i *05:01 (4,2%).

Kod naših pacijenata želeli smo da utvrdimo prisustvo antitela na Dsg3 i Dsg1. U skladu sa prethodno navedenom Dsg kompenzatornom teorijom, ukoliko su u serumu prisutna samo antiDsg1 antitela, bule se javljaju u površnim slojevima epiderma (kao što je slučaj kod PF), odnosno, ako su prisutna samo antiDsg3 antitela, promene se javljaju na mukozama (kao što je slučaj kod PM), i ukoliko su prisutna i antiDsg3 i antiDsg1 antitela, nema mogućnosti kompenzacije funkcija Dsg1 i Dsg3 što dovodi do ekstenzivnih promena i na koži i na sluzokožama (kao što je slučaj kod mukokutanih formi PV) [63, 227]. Pokazano je da pacijenti sa mukokutanim oblikom PV obično imaju antitela i na Dsg1 i Dsg3, dok oni sa mukoznim oblikom uglavnom samo antitela na Dsg3 [63, 228-230]. U oko 33-46% pacijenata, postoje međutim odstupanja antigenskog profila i kliničkog fenotipa [231-233]. Imunološki mehanizmi koji dovode do tranzicije antigenih epitopa Dsg3-Dsg1 tokom trajanja PV nisu u potpunosti razjašnjeni. Moguća objašnjenja za to su ili zbog fenomena širenja epitopa [73, 234] ili zbog ukrštene reaktivnosti autoreaktivnih T ćelija specifičnih za određene epitope Dsg3 ektodomena sa sličnim ili identičnim epitopima Dsg1 ektodomena [225].

Odstupanja u antigenskom profilu su moguća i zbog eventualnog postojanja drugih patogenih antitela usmerenih prema drugim komponentama dezmozoma ili pak prema intercelularnim domenima dezmogleina, što se ne može otkriti ukoliko se ELISA tehnikom određuju samo antitela na dezmogleine [151, 227, 235, 236].

Kod većine naših ispitanika (79,1%) postojala je korelacija antigenskog profila i kliničkog fenotipa. Odstupanja su postojala kod 20,9% pacijenta, 3 sa PM i 12 sa MCP (bilo odsustvo antiDsg3 i antiDsg1 kod oba podtipa PV ili odsustvo antiDsg3 uz prisustvo antiDsg1 kod MCP). Mortazavi i saradnici su kod 2/38 pacijenta sa PV zabeležili antigenski profil karakterističan za PF, i za jednog od njih zaključili da zbog odsustva antiDsg3 antitela nije došlo do formiranja lezija na sluzokožama [160]. Kod svih naših pacijenata sa MCP sa antigenim profilom za PF (Dsg3-/Dsg1+), postojale su lezije na sluzokožama, premda je mukozni skor (PDAI mukoza) bio nizak i kretao se od 6-10. Postojalo je odstupanje od očekivanog antigenskog profila (antiDsg1-/antiDsg3+ profil) i kod 9 pacijenata sa MCP, u aktivnoj fazi bolesti (novooboleli ili recidiv). Ekstenzivne kutane promene su postojale kod njih 5, kod kojih smo očekivali a nismo izmerili, visoke vrednosti antiDsg1 antitela. Kod dva pacijenta (u recidivu) bi se odsustvo antiDsg1 antitela moglo pripisati dotadašnjoj terapiji, dok za tri novoobolela pacijenta nemamo jasan odgovor. Treba napomenuti i da je od tri novoobolela pacijenta, jedna pacijentkinja bila romske etničke pripadnosti.

Odsustvo autoantitela je retko, posebno kod PM. Odsustvo antiDsg3 antitela kod naših pacijenata u remisiji (i PM i MCP) mogao bi se pripisati uticaju višemesečne terapije. Kod pacijenata u aktivnoj fazi bez antiDsg antitela (1 PM i 1 MCP), ovakav nalaz bi se mogao eventualno pripisati niskom stepenu aktivnosti bolesti (PDAI 11 za pacijenta sa PM, odnosno 38 za pacijenta sa MCP) ili, kao što je prethodno navedeno, zbog moguće uključenosti drugih epitopa u nastanak bolesti. Dalje, kod 7 naših pacijenata sa MCP i antigenim profilom karakterističnim za PF (anti-Dsg1+/anti-Dsg3-), 6 pacijenata je bilo u aktivnoj fazi bolesti (5 novoobolela, 1 u recidivu) dok je 1 pacijent bio u kompletnoj remisiji. S obzirom da je navedenih 6 pacijenata bilo u aktivnoj fazi bolesti, odsustvo antiDsg3 autoantitela se ne može pripisati toku bolesti odnosno uticaju terapije a budući da su pacijenti praćeni i dalje, do trenutka pisanja rezultata istraživanja, do sada nije došlo do tranzicije PV u PF. Verovatno su u patogenezi bolesti kod ovih pacijenata postojala druga autoantitela s obzirom na pozitivan nalaz IIF kod svih 6 pacijenata u aktivnoj fazi bolesti. Avegrinou i saradnici su kod grčkih pacijenata sa PV i odsustvom autoantitela (4/54), rezultate pripisali eventualnoj genetičkoj

specifičnosti populacije i faktorima životne sredine [237]. Na sličan zaključak bi mogli ukazati eventualno i kod naših pacijenata.

Svi naši pacijenti sa PM, sa pozitivnim antitelima, imali su samo antiDsg3 antitela. U drugim ispitivanim serijama, kod pacijenata sa PM, bila su prisutna i antiDsg1 antitela kod 12,5-52,9% [159, 228, 231, 237]. Kod pacijenata sa MCP, antiDsg1 antitela su postojala kod 60,9% a antiDsg3 kod 81,2%, što je nešto niže nego u drugim serijama pacijenata gde su antiDsg1 antitela bila prisutna kod 78,9-90,7% a antiDsg3 kod 94,7-100% pacijenata [159, 160, 237]. Treba svakako imati na umu da je možda niži procenat pacijenata sa MCP i antiDsg1 antitelima posledica toga što su u ovo istraživanje bili uključeni i pacijenti u remisiji. Ako posmatramo samo novoobolele pacijente sa MCP u našem istraživanju, kod 30/36 postojala su antiDsg1 antitela. Isto tako, od 40 novoobolelih pacijenata (pacijenti i sa MCP i PM), antiDsg3 antitela su postojala kod 34/40 (85%) što je slično kao i u istraživanjima drugih autora. Isto tako, sadržaj antiDsg u krvi pacijenata sa PV se razlikuje među ispitivanim populacijama. Mortazavi i saradnici su kod svojih pacijenata sa PV prikazali visoke vrednosti antiDsg1 (70,3% novoobolelih) [160] a rezultati su slični i u studijama iz Indije [238], što se razlikuje od pacijenata sa PV u Evropi, [154, 239]. Od 36 novoobolelih pacijenata sa MCP uključenih u ovo istraživanje, visoka koncentracija antiDsg1 (>100 RU/ml), postojala je kod 24/36.

Smatra se da titar antiDsg antitela korelira sa stepenom aktivnosti bolesti [63, 154, 161, 228, 229, 240]. Praćenje titra antiDsg1 i 3 je važno jer se povećanja titra mogu javiti i pre vidljivih kliničkih pogoršanja [63, 161]. Shodno dosadašnjim rezultatima istraživanja, zabeležili značajne razlike u visini titra i antiDsg1 i antiDsg3 između pacijenata u aktivnoj fazi bolesti (novooboleli i recidiv) i pacijenata u remisiji, mada je nakon korekcije, značajna razlika postojala samo u visini titra antiDsg1 antitela između novoobolelih i pacijenata u remisiji. Sa druge strane, jasna korelacija između antiDsg1 antitela i ekstenzivnosti mukoznih odnosno korelacija između antiDsg3 antitela i ekstenzivnosti kutanih promena nije dokazana. Shodno dosadašnjim istraživanjima, ni mi nismo zabeležili korelaciju između ekstenzivnosti kutanih promena (kutani PDAI) i koncentracije antiDsg3 antitela, odnosno ekstenzivnosti mukoznih promena (mukozni PDAI) i koncentracije antiDsg1 antitela.

Kod naših pacijenata su zabeležene značajna korelacija ukupnog stepena aktivnosti bolesti sa nivoom i antiDsg1, $p < 0,01$, značajna korelacija nivoa antiDsg3 i stepena aktivnosti bolesti na mukozama kod PM ($p < 0,05$), i visoko statistički značajnu korelaciju stepena aktivnosti

kutanih promena (kutani PDAI) i koncentracije antiDsg1 kod pacijenata sa MCP. Harman i saradnici [154], Sharma i saradnici [238], takođe su zabeležili značajnu korelaciju stepena aktivnosti bolesti kod pacijenata sa promenama samo na mukozama i visine antiDsg3 antitela, za razliku od Patsatsijeve i saradnika [241]. Sharma [238], Mortazavi [155], Patsatsi [241], Weiss i saradnici [242] su kod svojih pacijenata takođe opisali statistički značajnu korelaciju vrednosti antiDsg1 antitela i stepena aktivnosti bolesti na koži

Smatra se da je i dinamika smanjenja antiDsg1 i 3 kod pacijenata u remisiji slična. Ponekad kod pacijenata u kliničkoj remisiji može postojati visok titar antiDsg antitela [63, 228, 229, 241, 243, 244]. Naši rezultati su u skladu sa navedenim. Nestanak antiDsg3 i 1 antitela zabeležena je kod pacijenata koji su bili u remisiji, na terapiji održavanja. AntiDsg1 antitela su bila odsutna kod 9/13 a antiDsg3 kod 6/13. Opet, kod pacijenata u remisiji 6 i više meseci, bez ikakve terapije, antiDsg3 antitela su postojala u visokom titru kod 6/7 dok su antiDsg1 bila negativna kod svih 7 pacijenata. Kumar i saradnici su kod 2/3 pacijenata sa PV u kliničkoj remisiji 6 i više meseci, imali pozitivan titar antiDsg3 antitela [243].

Iako nije navedeno u ciljevima istraživanja, kako se IIF test radi pacijentima sa PV rutinski, prilikom hospitalizacije ili kontrole, budući da je za sve pacijente u isto vreme uzimana krv i za ELISA testiranje, želeli smo da utvrdimo da li postoji korelacija između IIF testa, nivoa antiDsg antitela i stepena aktivnosti bolesti. U ranijim istraživanjima IIF test je smatran značajnim markerom kliničke aktivnosti oboljenja; kasnija istraživanja ukazuju ipak da visina titra i klinička aktivnost bolesti nisu uvek u korelaciji [151, 245, 246]. Noviji rezultati ukazuju da iako se IIF test ne može smatrati kriterijumom za procenu aktivnosti oboljenja; praćenje dinamike titra može biti od značaja kod pacijenata u remisiji jer može služiti kao marker imunološke aktivnosti oboljenja, odnosno može doprinositi predviđanju recidiva [151, 154, 246]. Senzitivnost IIF testa zavisi od supstrata koji se koristi u testu. Ukoliko se koristi humana koža iznosi 83%, a kod korišćenja ezofagusa majmuna kao u našem istraživanju 90%. Ukoliko se kombinuju oba supstrata 100% [136, 154, 247, 248]. Daneshpazhooh i saradnici su u grupi od 61 novoobolela pacijenta sa PV našli statistički značajnu korelaciju IIF testa i aktivnosti bolesti (izraženom PAAS skorom); kao supstrat korišćen je humani prepucijum [249]. Kod naših pacijenata takođe je postojala značajna korelacija stepena aktivnosti bolesti vrednosti titra IIF testa, $p < 0,01$. Aksu i saradnici su kod svojih pacijenata zabeležili značajnu korelaciju IIF testa i stepena aktivnosti bolesti ali samo na mukozama, korelacija sa stepenom aktivnosti kutanih lezija ili sa ukupnim stepenom aktivnosti bolesti nije zabeležena [151]. Avgerinou i saradnici su kod svojih pacijenata našli statistički značajnu korelaciju visine titra

IIF testa i antiDsg1 antitela [237]. IIF test je bio pozitivan kod 65% njihovih pacijenata AntiDsg3 antitela postojala su kod 94,3% pacijenata sa pozitivnim IIF testom i 70,6% pacijenata sa negativnim IIF testom [237]. AntiDsg1 antitela postojala su 86,5% pacijenata sa pozitivnim IIF testom i kod 58,8% sa negativnim IIF testom [237]. U našoj seriji pozitivan IIF test ($>1/20$) postojao je kod 81,9% pacijenata. Zabeležena su antiDsg1 antitela kod 59,3% pacijenata sa pozitivnim IIF testom i kod 30,8% sa negativnim IIF testom, a antiDsg3 antitela kod 88,1% sa pozitivnim i 38,5% sa negativnim IIF testom. Postojala je statistički značajna korelacija između visine titra IIF testa i antiDsg1 i 3 antitela. Takođe smo pokazali da je postojala značajna saglasnost korelacije IIF testa i antiDsg3 antitela, odnosno dobra saglasnost vrednosti čime bismo mogli potvrditi da je i titar IIF testa validan marker u proceni aktivnosti bolesti. Dobra saglasnost IIF testa i antiDsg1 nije zabeležena, što govori u prilog rezultatima Aksua i saradnika, odnosno odsustvu korelacije sa kutanim stepenom aktivnosti bolesti kod svojih pacijenata [151].

Značajne razlike u distribuciji određenih alela u odnosu na podtipove pemfigusa u ovom istraživanju nismo zabeležili, mada je interpretacija možda bila neadekvatna zbog malog uzorka pacijenata sa PM.

Kao što su opisane razlike u distribuciji alela kod različitih etničkih pripadnosti, i u našem istraživanju smo zabeležili razlike. Značajne razlike u distribuciji DRB1* i DQB1* alela zabeležene su između pacijenata romske etničke pripadnosti i ostalih pacijenata uključenih u istraživanje. Zabeležene su razlike u distribuciji DRB1*04:02 alela, 64,5% pacijenata srpske i ostalih etničkih pripadnosti (rumunske, mađarske i pacijenti poreklom iz Crne Gore) i 20% romskih pacijenata ($p=0,013$), DRB1*14:04 alela, 12,9% pacijenata srpske i ostalih etničkih pripadnosti, 100% Romi, $p<0,01$, i DRB1* 14:54, 30,6% pacijenata srpske i ostalih etničkih pripadnosti, 0% Romi, $p<0,01$. Zabeležene su razlike DQB1*03:02 alela, 69,4% pacijenata srpske i ostalih etničkih pripadnosti, 20% Romi, $p=0,05$ i DQB1*05:03 alela, 43,5% pacijenata srpske i ostalih etničkih pripadnosti, 100% Romi, $p=0,01$. Ipak, romska podgrupa pacijenata je bila mala ($n=10$), pa se jasni zaključci ne mogu izvući a svakako nepostojanje učestalosti frekvencija alela u zdravoj populaciji Roma na teritoriji Evrope to takođe onemogućava.

U odnosu na polove, razlika u učestalosti određenih alela udruženih sa PV postojala je za DRB1*14 alelsku grupu odnosno za DRB1*14:04 i za DQB1*05:03 alele. Zabeležena je viša učestalost DRB1*04:02-DQB1*03:02 haplotipa kod ženskih nego kod muških pacijenata. Nije bilo značajnih razlika učestalosti DRB1*04-DQB1*05:03 haplotipa među polovima. S

obzirom na neravnomernu zastupljenost polova u ovom istraživanju, skoro duplo veću zastupljenosti ženske populacije, odnosno više nego dvostruku zastupljenost muškaraca u podgrupi pacijenata romske etničke pripadnosti, pitanje je i validnosti ovakvih rezultata. Kod slovačkih pacijenata (27 žena, 17 muškaraca), Švecova i saradnici su nosioce DRB1*14:54 imali samo među muškim pacijentima; autori nemaju objašnjenje za ovakav nalaz [250]. Ni mi nemamo adekvatan odgovor na ovakvu raspodelu među polovima. Slično je i sa rezultatima koji se odnose na udruženost pojedinih alela sa starošću pacijenata na početku bolesti. U našoj seriji pacijenata, značajne razlike u odnosu na uzrast oboljevanja zabeležene su u odnosu na nosioce ili ne DRB1*14:04 alela (46,1 i 56 godina, $p=0,016$), i nosioce ili ne DRB1*14-DQB1*05 haplotipa (49,94 i 56,95 godina, $p=0,05$). Treba imati na umu da ovakvim rezultatima značajno doprinosi to da su svi Romi bili nosioci DRB1*14:04 alela, kod kojih je svakako zabeležen niži uzrast oboljevanja od PV, kako kod nas, tako i u drugim istraživanjima.

Ispitujući udruženost pojedinih alela sa koncentracijom anti Dsg antitela u krvi pacijenata nismo našli statistički značajne razlike stepena aktivnosti bolesti ili nivoa antiDsg3 i 1 antitela kod pacijenata i prisustva nekog od patogenih alela, za razliku od Švecove i saradnika [250]. Poređenja su rađena za pacijente sa aktivnim oboljenjem (novooboleli pacijenti i pacijenti u recidivu). Kao što smo naveli u odeljku rezultata, iako su bile evidentne razlike u prosečnim vrednostima i Dsg1 i 3 i stepena aktivnosti bolesti, zbog visokog varijabiliteta, ove vrednosti nisu bile statistički značajne. Iako nije dokazana statistička značajnost upoređivanjem PDAI sa prisustvom DRB1*14:04 alela, svakako je stepen aktivnosti bolesti bio značajno viši kod pacijenata romske populacije nego kod pacijenata srpske etničke pripadnosti. Iako je pretpostavka je da, ako su pacijenti nosioci oba patogena alela (DRB1*04:02 i DQB1*5:03) alela, povećan je rizik razvoja pemfigusa, kod naših pacijenata nosilaca obe alela/alelske grupe, nismo našli statističke značajnosti uzrasta oboljevanja ili težine kliničke slike, kao ni kliničkog fenotipa.

U Srbiji do sada nisu sprovedena istraživanja polimorfizma HLA-DR i HLA-DQ alela kod pacijenata sa pemfigusom. Ovo istraživanje je po prvi put pokazalo distribuciju genskih alela koji kodiraju HLA molekule II klase kod pacijenata sa PV na teritoriji Srbije. Na osnovu iznetih rezultata, pokazali smo da je učestalost alela i haplotipova kod pacijenata na teritoriji Srbije slična kao u dosadašnjim istraživanjima i izveli sledeće navedene zaključke.

6. ZAKLJUČCI

1. Zastupljenost mukokutanog oblika pemfigus vulgarisa bila je slična kao u ostalim istraživanjima. Veća je bila zastupljenost pacijenata ženskog pola kod pacijenata srpske etničke pripadnosti, dok je u romskoj populaciji pacijenata bila viša učestalost muškaraca. Pacijenti romske etničke pripadnosti su bili znatno mlađi kada je bolest počela i stepen aktivnosti bolesti je bio viši nego kod pacijenata srpske etničke pripadnosti.
2. Frekvencija DRB1*04 i DRB1*14 alelskih grupa je bila značajno viša a DRB1*11 značajno niža kod pacijenata sa PV nego kod zdravih osoba. Zbog toga se može smatrati da DRB1*04 i *14 povećavaju rizik nastanka pemfigusa dok bi se DRB1*11 alelska grupa mogla smatrati protektivnom u našoj populaciji. Frekvencija DRB1*03 i DRB1*15 alelskih grupa je takođe bilo niža u grupi obolelih, blizu nivoa statističke značajnosti, pa bi se uslovno takođe mogli smatrati protektivnim alelima.
3. Frekvencija DRB1*04:02 i *14:04 alela kod pacijenata obolelih od PV je bila značajno viša nego kod zdravih. Prisustvo DRB1*14:54 alela verovatno povećava rizik za nastanak bolesti ali se nakon korekcije statistička značajnost gubi.
4. Učestalosti DQB1*alelskih grupa kod pacijenata nisu bile značajno različite u odnosu na zdravu populaciju ali su učestalosti DQB1*03:02 i DQB1*05:03 alela kod obolelih od PV bile značajno više.
5. DRB1*04-DQB1*03 i DRB1*14-DQB1*05 haplotipovi, odnosno DRB1*04:02-DQB1*03:02 i DRB1*14:04-DQB1*05:03 haplotipovi su bili značajno češći kod pacijenata nego kod zdravih osoba.
6. DRB1*11-DQB1*03, DRB1*01-DQB1*05 i DRB1*03-DQB1*02 haplotipovi, su bili značajno ređi kod pacijenata sa PV, te bi se ovi haplotipovi mogli smatrati protektivnim.
7. Prikazane su učestalosti alela ispitivanih polimorfizama za HLA-DRB1* i DQB1* lokuse kod pacijenata sa PV u Srbiji i kod obolelih od PV na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla.

8. Distribucije DRB1*04:02, DRB1*14:04, DRB1*14:54 kao i DQB1*03:02 i DQB1*05:03 alela su se značajno razlikovale između populacije romskih pacijenata i pacijenata drugih etničkih pripadnosti. Pokazana je statistički značajna razlika uzrasta pojave oboljenja kod pacijenata nosilaca DRB1*14:04 alela u odnosu na druge patogene alele. Budući da je više od 50% nosilaca DRB1*14:04 alela kod kojih je već pokazana značajna razlika u uzrastu pojave oboljenja, vrlo je moguće da je ovakva distribucija uticala na rezultat.
9. Postojala je statistički značajna razlika učestalosti DRB1*14 alelske grupe odnosno DRB1*14:04 alela između muškaraca i žena, kao i DRB1*04:02-DQB1*03:02 među polovima. Verovatni uticaj na ovakav rezultat ima neravnomerna zastupljenost pacijenata muškog i ženskog pola. Nije pokazana korelacija patogenih alela sa stepenom aktivnosti bolesti ili koncentracijom antiDsg1 i 3 antitela
10. Korelacija antigenskog profila sa kliničkim fenotipom postojala je kod većine pacijenata (79.1%). Kod pacijenata sa pemfigusom mukoza postojala su samo antiDsg3 antitela. Pokazana je značajna korelacija ukupnog stepena aktivnosti bolesti sa koncentracijom očekivanih antiDsg antitela kao i značajna korelacija imunoloških parametara oboljenja - visine titra IIF testa i nivoa antiDsg antitela.

7. LITERATURA

1. Bystryń JC, Rudolph JL, 2005. **Pemphigus**. *Lancet* 366, 61-73. [[PubMed](#)]
2. Ioannides D, Lazaridou E, Rigopoulos D, 2008. **Pemphigus**. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22, 1478-1496. [[PubMed](#)]
3. Meyer N, Misery L, 2010. **Geoepidemiologic considerations of auto-immune pemphigus**. *Autoimmun Rev* 9, A379-382. [[PubMed](#)]
4. VĽckova-Laskoska MT, Laskoski DS, Kamberova S, Caca-Biljanovska N, Volckova N, 2007. **Epidemiology of pemphigus in Macedonia: a 15-year retrospective study (1990-2004)**. *International journal of dermatology* 46, 253-258. [[PubMed](#)]
5. Joly P, Litrowski N, 2011. **Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis)**. *Clin Dermatol* 29, 432-436. [[PubMed](#)]
6. Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooh M, Esmaili N, Balighi K, Hallaji Z, Barzegari M, Akhiani M, Ghodsi Z, Mortazavi H *et al*, 2005. **Pemphigus: analysis of 1209 cases**. *International journal of dermatology* 44, 470-476. [[PubMed](#)]
7. Bastuji-Garin S, Souissi R, Blum L, Turki H, Noura R, Jomaa B, Zahaf A, Ben Osman A, Mokhtar I, Fazaa B *et al*, 1995. **Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women**. *The Journal of investigative dermatology* 104, 302-305. [[PubMed](#)]
8. Tsankov N, Vassileva S, Kamarashev J, Kazandjieva J, Kuzeva V, 2000. **Epidemiology of pemphigus in Sofia, Bulgaria. A 16-year retrospective study (1980-1995)**. *International journal of dermatology* 39, 104-108. [[PubMed](#)]
9. Michailidou EZ, Belazi MA, Markopoulos AK, Tsatsos MI, Mourellou ON, Antoniadou DZ, 2007. **Epidemiologic survey of pemphigus vulgaris with oral manifestations in northern Greece: retrospective study of 129 patients**. *International journal of dermatology* 46, 356-361. [[PubMed](#)]
10. Baican A, Baican C, Chiriac G, Chiriac MT, Macovei V, Zillikens D, Ciuce D, Sitaru C, 2010. **Pemphigus vulgaris is the most common autoimmune bullous disease in Northwestern Romania**. *International journal of dermatology* 49, 768-774. [[PubMed](#)]
11. Uzun S, Durdu M, Akman A, Gunasti S, Uslular C, Memisoglu HR, Alpsoy E, 2006. **Pemphigus in the Mediterranean region of Turkey: a study of 148 cases**. *International journal of dermatology* 45, 523-528. [[PubMed](#)]
12. Marazza G, Pham HC, Schärer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trueb RM, Hohl D, Itin P, Lautenschlager S, Naldi L *et al*, 2009. **Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study**. *Br J Dermatol* 161, 861-868. [[PubMed](#)]
13. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Brocker EB, Zillikens D, 2002. **Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans**. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16, 68-71. [[PubMed](#)]
14. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J, 2008. **Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study**. *BMJ* 337, a180. [[PubMed](#)]

15. Nanda A, Dvorak R, Al-Saeed K, Al-Sabah H, Alsaleh QA, 2004. **Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait.** *International journal of dermatology* 43, 876-881. [[PubMed](#)]
16. Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Payandemehr P, Nassiri S, Valikhani M, Safai-Naraghi Z, 2012. **Spectrum of autoimmune bullous diseases in Iran: a 10-year review.** *International journal of dermatology* 51, 35-41. [[PubMed](#)]
17. Zaraa I, Kerkeni N, Ishak F, Zribi H, El Euch D, Mokni M, Osman AB, 2011. **Spectrum of autoimmune blistering dermatoses in Tunisia: an 11-year study and a review of the literature.** *International journal of dermatology* 50, 939-944. [[PubMed](#)]
18. Wohl Y, Brenner S, 2003. **Pemphigus in Israel--an epidemiologic analysis of cases in search of risk factors.** *Isr Med Assoc J* 5, 410-412. [[PubMed](#)]
19. Golusin Z, Poljacki M, Jovanovic M, Ethuran V, Stojanovic S, Rajic N, 2005. **Some epidemiological features of pemphigus chronicus in South Vojvodina: a 12-year retrospective study.** *International journal of dermatology* 44, 792-793. [[PubMed](#)]
20. Mimouni D, Bar H, Gdalevich M, Katzenelson V, David M, 2010. **Pemphigus, analysis of 155 patients.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24, 947-952. [[PubMed](#)]
21. Abdolsamadi HR, Abdollahzadeh S, Bakianian Vaziri P, Beheshti A, Shafigh E, Vahedi M, 2007. **Epidemiology of pemphigus in tehran, iran: a 20-year retrospective study.** *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 1, 108-113. [[PubMed](#)]
22. Salmanpour R, Shahkar H, Namazi MR, Rahman-Shenas MR, 2006. **Epidemiology of pemphigus in south-western Iran: a 10-year retrospective study (1991-2000).** *International journal of dermatology* 45, 103-105. [[PubMed](#)]
23. Mahajan VK, Sharma NL, Sharma RC, Garg G, 2005. **Twelve-year clinico-therapeutic experience in pemphigus: a retrospective study of 54 cases.** *International journal of dermatology* 44, 821-827. [[PubMed](#)]
24. Kulthanan K, Chularojanamontri L, Tuchinda P, Sirikudta W, Pinkaew S, 2011. **Clinical features and course of pemphigus in Thai patients.** *Asian Pac J Allergy Immunol* 29, 161-168. [[PubMed](#)]
25. Tallab T, Joharji H, Bahamdan K, Karkashan E, Mourad M, Ibrahim K, 2001. **The incidence of pemphigus in the southern region of Saudi Arabia.** *International journal of dermatology* 40, 570-572. [[PubMed](#)]
26. Micali G, Musumeci ML, Nasca MR, 1998. **Epidemiologic analysis and clinical course of 84 consecutive cases of pemphigus in eastern Sicily.** *International journal of dermatology* 37, 197-200. [[PubMed](#)]
27. Benchikhi H, Ghafour S, Disky A, Bichra L, Nejjam F, Lakhdar H, 2008. **Pemphigus: analysis of 262 cases.** *International journal of dermatology* 47, 973-975. [[PubMed](#)]
28. Aboobaker J, Morar N, Ramdial PK, Hammond MG, 2001. **Pemphigus in South Africa.** *International journal of dermatology* 40, 115-119. [[PubMed](#)]
29. Esmaili N, Chams-Davatchi C, Valikhani M, Daneshpazhooh M, Balighi K, Hallaji Z, Barzegari M, Akhyani M, Ghodsi ZS, Mrotazavi H *et al*, 2007. **Pemphigus vulgaris in Iran: a clinical study of 140 cases.** *International journal of dermatology* 46, 1166-1170. [[PubMed](#)]

30. Sustic N, Rucevic I, Barisic-Drusko V, 2005. **Epidemiology of acquired bullous diseases in Eastern Croatia: a retrospective prewar to postwar study.** *Acta Dermatovenerol Croat* 13, 228-232. [[PubMed](#)]
31. Amin MN, Islam AZ, 2006. **Clinical, histologic and immunologic features of pemphigus in Bangladesh.** *International journal of dermatology* 45, 1317-1318. [[PubMed](#)]
32. Sansaricq F, Stein SL, Petronic-Rosic V, 2012. **Autoimmune bullous diseases in childhood.** *Clin Dermatol* 30, 114-127. [[PubMed](#)]
33. Popadic S, Medenica L, Skiljevic D, Djakovic Z, Nikolic M, 2011. **Pemphigus vulgaris in three adolescents: the course of the disease.** *The Australasian journal of dermatology* 52, e3-7. [[PubMed](#)]
34. Mabrouk D, Ahmed AR, 2011. **Analysis of current therapy and clinical outcome in childhood pemphigus vulgaris.** *Pediatr Dermatol* 28, 485-493. [[PubMed](#)]
35. Gushi M, Yamamoto Y, Mine Y, Awazawa R, Nonaka K, Taira K, Asato Y, Hagiwara K, Uezato H, 2008. **Neonatal pemphigus vulgaris.** *The Journal of dermatology* 35, 529-535. [[PubMed](#)]
36. Ong CS, Cook N, Lee S, 2000. **Drug-related pemphigus and angiotensin converting enzyme inhibitors.** *The Australasian journal of dermatology* 41, 242-246. [[PubMed](#)]
37. Tron F, Gilbert D, Mouquet H, Joly P, Drouot L, Makni S, Masmoudi H, Charron D, Zitouni M, Loiseau P *et al*, 2005. **Genetic factors in pemphigus.** *J Autoimmun* 24, 319-328. [[PubMed](#)]
38. Nancy AL, Yehuda S, 2009. **Prediction and prevention of autoimmune skin disorders.** *Archives of dermatological research* 301, 57-64. [[PubMed](#)]
39. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD, 2008. **Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis.** *PLoS Genet* 4, e1000024. [[PubMed](#)]
40. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK, 2009. **The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease.** *J Hum Genet* 54, 15-39. [[PubMed](#)]
41. Tiercy JM, 2002. **Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation.** *Transpl Immunol* 9, 173-180. [[PubMed](#)]
42. Andric Z, 2014. **Determination of human leukocyte antigen locus polymorphisms in a population of potential stem cell donors in Serbia. Doctoral dissertation. University of Belgrade, School of Medicine.** [[Link](#)]
43. Slomov E, Loewenthal R, Korostishevsky M, Goldberg I, Brenner S, Gazit E, 2005. **Pemphigus vulgaris is associated with the transporter associated with antigen processing (TAP) system.** *Hum Immunol* 66, 1213-1222. [[PubMed](#)]
44. Niizeki H, Kumagai S, Kanagawa S, Amagai M, Yamashina Y, Asada H, Nishikawa T, Miyagawa S, 2004. **Exclusion of the TAP1 and TAP2 genes within the HLA class II region as candidate susceptibility genes to pemphigus in the Japanese population.** *J Dermatol Sci* 36, 122-124. [[PubMed](#)]
45. Tron F, Gilbert D, Joly P, Mouquet H, Drouot L, Ayed MB, Sellami M, Masmoudi H, Makni S, 2006. **Immunogenetics of pemphigus: an update.** *Autoimmunity* 39, 531-539. [[PubMed](#)]

46. Mobini N, Ahmed AR, 1993. **Immunogenetics of drug-induced bullous diseases.** *Clin Dermatol* 11, 449-460. [[PubMed](#)]
47. Sanchez-Mazas A, Vidan-Jeras B, Nunes JM, Fischer G, Little AM, Bekmane U, Buhler S, Buus S, Claas FH, Dormoy A *et al*, 2012. **Strategies to work with HLA data in human populations for histocompatibility, clinical transplantation, epidemiology and population genetics: HLA-NET methodological recommendations.** *International journal of immunogenetics* 39, 459-472; quiz 473-456. [[PubMed](#)]
48. Scharf SJ, Freidmann A, Steinman L, Brautbar C, Erlich HA, 1989. **Specific HLA-DQB and HLA-DRB1 alleles confer susceptibility to pemphigus vulgaris.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6215-6219. [[PubMed](#)]
49. Martel P, Joly P, 2001. **Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules.** *Clin Dermatol* 19, 662-674. [[PubMed](#)]
50. Carcassi C, Cottoni F, Floris L, Vacca A, Mulargia M, Arras M, Boero R, La Nasa G, Ledda A, Pizzati A *et al*, 1996. **HLA haplotypes and class II molecular alleles in Sardinian and Italian patients with pemphigus vulgaris.** *Tissue antigens* 48, 662-667. [[PubMed](#)]
51. Shams S, Amirzargar AA, Yousefi M, Rezaei N, Solgi G, Khosravi F, Ansari-pour B, Moradi B, Nikbin B, 2009. **HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris.** *J Clin Immunol* 29, 175-179. [[PubMed](#)]
52. Lee E, Lendas KA, Chow S, Pirani Y, Gordon D, Dionisio R, Nguyen D, Spizuoco A, Fotino M, Zhang Y *et al*, 2006. **Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris.** *Hum Immunol* 67, 125-139. [[PubMed](#)]
53. Tunca M, Musabak U, Sagkan RI, Koc E, Akar A, 2010. **Association of human leukocyte antigen class II alleles with pemphigus vulgaris in a Turkish population.** *The Journal of dermatology* 37, 246-250. [[PubMed](#)]
54. Delgado JC, Yunis DE, Bozon MV, Salazar M, Deulofeut R, Turbay D, Mehra NK, Pasricha JS, Raval RS, Patel H *et al*, 1996. **MHC class II alleles and haplotypes in patients with pemphigus vulgaris from India.** *Tissue antigens* 48, 668-672. [[PubMed](#)]
55. Lombardi ML, Mercurio O, Tecame G, Fusco C, Ruocco V, Salerno A, Pirozzi G, Manzo C, 1996. **Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris.** *Tissue antigens* 47, 228-230. [[PubMed](#)]
56. Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V, Pirozzi G, Manzo C, 1999. **Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients.** *The Journal of investigative dermatology* 113, 107-110. [[PubMed](#)]
57. Miyagawa S, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, 2002. **Genotyping for HLA-A, B and C alleles in Japanese patients with pemphigus: prevalence of Asian alleles of the HLA-B15 family.** *Br J Dermatol* 146, 52-58. [[PubMed](#)]

58. Saha M, Harman K, Mortimer NJ, Binda V, Black MM, Kondeatis E, Vaughan R, Groves RW, 2010. **Pemphigus vulgaris in White Europeans is linked with HLA Class II allele HLA DRB1*1454 but not DRB1*1401.** *The Journal of investigative dermatology* 130, 311-314. [[PubMed](#)]
59. Parnicka Z, Svecova D, Javor J, Shawkatova I, Buc M, 2013. **High susceptibility to pemphigus vulgaris due to HLA-DRB1*14:54 in the Slovak population.** *International journal of immunogenetics* 40, 471-475. [[PubMed](#)]
60. Wucherpennig KW, Yu B, Bhol K, Monos DS, Argyris E, Karr RW, Ahmed AR, Strominger JL, 1995. **Structural basis for major histocompatibility complex (MHC)-linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self-peptides in pemphigus vulgaris.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11935-11939. [[PubMed](#)]
61. Hertl M, Eming R, Veldman C, 2006. **T cell control in autoimmune bullous skin disorders.** *The Journal of clinical investigation* 116, 1159-1166. [[PubMed](#)]
62. Grando SA, 2012. **Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities.** *Autoimmunity* 45, 7-35. [[PubMed](#)]
63. Amagai M, 2010. **Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 524-537. [[PubMed](#)]
64. Hashimoto T, 2003. **Recent advances in the study of the pathophysiology of pemphigus.** *Archives of dermatological research* 295 Suppl 1, S2-11. [[PubMed](#)]
65. Kitajima Y, 2013. **New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease.** *Kaohsiung J Med Sci* 29, 1-13. [[PubMed](#)]
66. Chernyavsky AI, Arredondo J, Piser T, Karlsson E, Grando SA, 2008. **Differential coupling of M1 muscarinic and alpha7 nicotinic receptors to inhibition of pemphigus acantholysis.** *J Biol Chem* 283, 3401-3408. [[PubMed](#)]
67. Cabrijan L, Lipozencic J, 2011. **Adhesion molecules in keratinocytes.** *Clin Dermatol* 29, 427-431. [[PubMed](#)]
68. McGrath JA, 2005. **Inherited disorders of desmosomes.** *The Australasian journal of dermatology* 46, 221-229. [[PubMed](#)]
69. Dworschak J, Recke A, Freitag M, Ludwig RJ, Langenhan J, Kreuzer OJ, Zillikens D, Schmidt E, 2012. **Mapping of B cell epitopes on desmoglein 3 in pemphigus vulgaris patients by the use of overlapping peptides.** *J Dermatol Sci* 65, 102-109. [[PubMed](#)]
70. Seshadri D, Kumaran MS, Kanwar AJ, 2013. **Acantholysis revisited: back to basics.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 79, 120-126. [[PubMed](#)]
71. Satyam A, Khandpur S, Sharma VK, Sharma A, 2009. **Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-Pemphigus vulgaris.** *Immunol Invest* 38, 498-509. [[PubMed](#)]
72. Loiseau P, Leclach L, Prost C, Lepage V, Busson M, Bastuji-Garin S, Roujeau JC, Charron D, 2000. **HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus.** *J Autoimmun* 15, 67-73. [[PubMed](#)]

73. Yokoyama T, Amagai M, 2010. **Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice.** *The Journal of dermatology* 37, 205-213. [[PubMed](#)]
74. Sharma P, Mao X, Payne AS, 2007. **Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus.** *J Dermatol Sci* 48, 1-14. [[PubMed](#)]
75. Lanza A, Femiano F, De Rosa A, Cammarota M, Lanza M, Cirillo N, 2006. **The N-terminal fraction of desmoglein 3 encompassing its immunodominant domain is present in human serum: implications for pemphigus vulgaris autoimmunity.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 19, 399-407. [[PubMed](#)]
76. Pan M, Liu X, Zheng J, 2011. **The pathogenic role of autoantibodies in pemphigus vulgaris.** *Clin Exp Dermatol* 36, 703-707. [[PubMed](#)]
77. Vu TN, Lee TX, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Dahl MV, Lynch PJ, Grando SA, 1998. **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* 134, 971-980. [[PubMed](#)]
78. Kalantari-Dehaghi M, Molina DM, Farhadieh M, Morrow WJ, Liang X, Felgner PL, Grando SA, 2011. **New targets of pemphigus vulgaris antibodies identified by protein array technology.** *Exp Dermatol* 20, 154-156. [[PubMed](#)]
79. Fania L, Zampetti A, Guerriero G, Feliciani C, 2012. **Alteration of cholinergic system in keratinocytes cells produces acantholysis: a possible use of cholinergic drugs in pemphigus vulgaris.** *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 11, 238-242. [[PubMed](#)]
80. Veldman C, Feliciani C, 2008. **Pemphigus: a complex T cell-dependent autoimmune disorder leading to acantholysis.** *Clin Rev Allergy Immunol* 34, 313-320. [[PubMed](#)]
81. Schmidt E, Dahnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Schlumberger W, Stocker W, Hashimoto T, Brocker EB *et al*, 2010. **Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients.** *Exp Dermatol* 19, 458-463. [[PubMed](#)]
82. Valikhani M, Kavusi S, Chams-Davatchi C, Daneshpazhooh M, Barzegari M, Ghiasi M, Abedini R, 2007. **Pemphigus and associated environmental factors: a case-control study.** *Clin Exp Dermatol* 32, 256-260. [[PubMed](#)]
83. Marchenko S, Chernyavsky AI, Arredondo J, Gindi V, Grando SA, 2010. **Antimitochondrial autoantibodies in pemphigus vulgaris: a missing link in disease pathophysiology.** *J Biol Chem* 285, 3695-3704. [[PubMed](#)]
84. Mosaad YM, Fathy H, Fawzy Z, El-Saied MA, 2012. **Tumor necrosis factor-alpha -308 G>A and interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphisms and pemphigus.** *Hum Immunol* 73, 560-565. [[PubMed](#)]
85. Di Bisceglie MB, Lucchese A, Crincoli V, 2009. **Pemphigus: the promises of peptide immunotherapy.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31, 509-515. [[PubMed](#)]
86. Grando SA, 2006. **Pemphigus in the XXI century: new life to an old story.** *Autoimmunity* 39, 521-530. [[PubMed](#)]

87. Schmidt E, Waschke J, 2009. **Apoptosis in pemphigus.** *Autoimmun Rev* 8, 533-537. [[PubMed](#)]
88. Bektas M, Jolly P, Rubenstein DS, 2010. **Apoptotic pathways in pemphigus.** *Dermatol Res Pract* 2010, 456841. [[PubMed](#)]
89. Frusic-Zlotkin M, Pergamentz R, Michel B, David M, Mimouni D, Bregegere F, Milner Y, 2005. **The interaction of pemphigus autoimmunoglobulins with epidermal cells: activation of the fas apoptotic pathway and the use of caspase activity for pathogenicity tests of pemphigus patients.** *Ann N Y Acad Sci* 1050, 371-379. [[PubMed](#)]
90. Grando SA, Bystryń JC, Chernyavsky AI, Frusic-Zlotkin M, Gniadecki R, Lotti R, Milner Y, Pittelkow MR, Pincelli C, 2009. **Apoptolysis: a novel mechanism of skin blistering in pemphigus vulgaris linking the apoptotic pathways to basal cell shrinkage and suprabasal acantholysis.** *Exp Dermatol* 18, 764-770. [[PubMed](#)]
91. Jolly PS, Berkowitz P, Bektas M, Lee HE, Chua M, Diaz LA, Rubenstein DS, 2010. **p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis.** *J Biol Chem* 285, 8936-8941. [[PubMed](#)]
92. Brenner S, Tur E, Shapiro J, Ruocco V, D'Avino M, Ruocco E, Tsankov N, Vassileva S, Drenovska K, Brezoev P *et al*, 2001. **Pemphigus vulgaris: environmental factors. Occupational, behavioral, medical, and qualitative food frequency questionnaire.** *International journal of dermatology* 40, 562-569. [[PubMed](#)]
93. Brenner S, Mashiah J, Tamir E, Goldberg I, Wohl Y, 2003. **PEMPHIGUS: an acronym for a disease with multiple etiologies.** *Skinmed* 2, 163-167. [[PubMed](#)]
94. Heymann AD, Chodick G, Kramer E, Green M, Shalev V, 2007. **Pemphigus variant associated with penicillin use: a case-cohort study of 363 patients from Israel.** *Arch Dermatol* 143, 704-707. [[PubMed](#)]
95. Brenner S, Goldberg I, 2011. **Drug-induced pemphigus.** *Clin Dermatol* 29, 455-457. [[PubMed](#)]
96. Scully C, Challacombe SJ, 2002. **Pemphigus vulgaris: update on etiopathogenesis, oral manifestations, and management.** *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 397-408. [[PubMed](#)]
97. Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R, 2013. **Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies.** *Clin Dermatol* 31, 374-381. [[PubMed](#)]
98. Baroni A, Russo T, Faccenda F, Piccolo V, 2012. **Amoxicillin/clavulanic acid-induced pemphigus vulgaris: case report.** *Acta Dermatovenerol Croat* 20, 108-111. [[PubMed](#)]
99. Brenner S, Srebrnik A, Goldberg I, 2003. **Pemphigus can be induced by topical phenol as well as by foods and drugs that contain phenols or thiols.** *J Cosmet Dermatol* 2, 161-165. [[PubMed](#)]
100. Baroni A, Puca RV, Aiello FS, Palla M, Faccenda F, Voza G, Sangiuliano S, Ruocco E, 2009. **Cefuroxime-induced pemphigus erythematosus in a young boy.** *Clin Exp Dermatol* 34, 708-710. [[PubMed](#)]
101. Parodi A, Cozzani E, Milesi G, Drosera M, Rebora A, 2002. **Fosinopril as a possible pemphigus-inducing drug.** *Dermatology* 204, 139-141. [[PubMed](#)]

102. Anadolu RY, Birol A, Bostanci S, Boyvatt A, 2002. **A case of pemphigus vulgaris possibly triggered by quinolones.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16, 152-153. [[PubMed](#)]
103. Bayramgurler D, Ercin C, Apaydin R, Unal G, 2001. **Indapamide-induced pemphigus foliaceus.** *J Dermatolog Treat* 12, 175-177. [[PubMed](#)]
104. Patterson CR, Davies MG, 2003. **Carbamazepine-induced pemphigus.** *Clin Exp Dermatol* 28, 98-99. [[PubMed](#)]
105. Ghaffarpour G, Jalali MH, Yaghmaei B, Mazloomi S, Soltani-Arabshahi R, 2006. **Chloroquine/hydroxychloroquine-induced pemphigus.** *International journal of dermatology* 45, 1261-1263. [[PubMed](#)]
106. Patterson CR, Davies MG, 2004. **Pemphigus foliaceus: an adverse reaction to lisinopril.** *J Dermatolog Treat* 15, 60-62. [[PubMed](#)]
107. Caldarola G, Feliciani C, 2011. **A glass of red wine to keep vascular disease at bay, but what about pemphigus vulgaris?** *Expert Rev Clin Immunol* 7, 187-191. [[PubMed](#)]
108. Ruocco V, Brenner S, Ruocco E, 2001. **Pemphigus and diet: does a link exist?** *International journal of dermatology* 40, 161-163. [[PubMed](#)]
109. Reis VM, Toledo RP, Lopez A, Diaz LA, Martins JE, 2000. **UVB-induced acantholysis in endemic Pemphigus foliaceus (Fogo selvagem) and Pemphigus vulgaris.** *J Am Acad Dermatol* 42, 571-576. [[PubMed](#)]
110. Goldberg I, Sasson O, Brenner S, 2001. **A case of phenol-related contact pemphigus.** *Dermatology* 203, 355-356. [[PubMed](#)]
111. Bauza A, Del Pozo LJ, Saus C, Martin A, 2009. **Pemphigus-like lesions induced by imiquimod.** *Clin Exp Dermatol* 34, e60-62. [[PubMed](#)]
112. Lo Schiavo A, Sangiuliano S, Puca RV, Brunetti G, Ruocco E, Cozzi R, 2008. **Contact pemphigus: a side-effect of imiquimod therapy.** *International journal of dermatology* 47, 765-767. [[PubMed](#)]
113. Sagi L, Sherer Y, Trau H, Shoenfeld Y, 2008. **Pemphigus and infectious agents.** *Autoimmun Rev* 8, 33-35. [[PubMed](#)]
114. Berkun Y, Mimouni D, Shoenfeld Y, 2005. **Pemphigus following hepatitis B vaccination--coincidence or causality?** *Autoimmunity* 38, 117-119. [[PubMed](#)]
115. De Simone C, Caldarola G, D'Agostino M, Zampetti A, Amerio P, Feliciani C, 2008. **Exacerbation of pemphigus after influenza vaccination.** *Clin Exp Dermatol* 33, 718-720. [[PubMed](#)]
116. Valikhani M, Kavusi S, Chams-Davatchi C, Hallaji Z, Esmaili N, Ghandi N, Farahani F, Lajevardi V, 2008. **Impact of smoking on pemphigus.** *International journal of dermatology* 47, 567-570. [[PubMed](#)]
117. Morell-Dubois S, Carpentier O, Cottencin O, Queyrel V, Hachulla E, Hatron PY, Delaporte E, 2008. **Stressful life events and pemphigus.** *Dermatology* 216, 104-108. [[PubMed](#)]

118. Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Valikhani M, Aghabagheri A, Mortazavizadeh SM, Barzegari M, Akhyani M, Hallaji Z, Esmaili N, Ghodsi SZ, 2011. **Pemphigus and pregnancy: a 23-year experience.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 77, 534. [[PubMed](#)]
119. Bialynicki-Birula R, Dmochowski M, Maj J, Gornowicz-Porowska J, 2011. **Pregnancy-triggered maternal pemphigus vulgaris with persistent gingival lesions.** *Acta Dermatovenerol Croat* 19, 170-175. [[PubMed](#)]
120. Drenovska K, Darlenski R, Kazandjieva J, Vassileva S, 2010. **Pemphigus vulgaris and pregnancy.** *Skinmed* 8, 144-149. [[PubMed](#)]
121. Nousari HC, Kimyai-Asadi A, Ketabchi N, Diaz LA, Anhalt GJ, 1999. **Severe nonendemic pemphigus foliaceus presenting in the postpartum period.** *J Am Acad Dermatol* 40, 845-846. [[PubMed](#)]
122. Kardos M, Levine D, Gurcan HM, Ahmed RA, 2009. **Pemphigus vulgaris in pregnancy: analysis of current data on the management and outcomes.** *Obstet Gynecol Surv* 64, 739-749. [[PubMed](#)]
123. Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS, 1999. **The new pemphigus variants.** *J Am Acad Dermatol* 40, 649-671; quiz 672-643. [[PubMed](#)]
124. Kitajima Y, 2003. **Current and prospective understanding of clinical classification, pathomechanisms and therapy in pemphigus.** *Archives of dermatological research* 295 Suppl 1, S17-23. [[PubMed](#)]
125. Kitajima Y, Aoyama Y, 2007. **A perspective of pemphigus from bedside and laboratory-bench.** *Clin Rev Allergy Immunol* 33, 57-66. [[PubMed](#)]
126. Yazganoglu KD, Baykal C, Kucukoglu R, 2006. **Childhood pemphigus vulgaris: five cases in 16 years.** *The Journal of dermatology* 33, 846-849. [[PubMed](#)]
127. Kanwar AJ, Sawatkar GU, Vinay K, Hashimoto T, 2012. **Childhood pemphigus vulgaris successfully treated with rituximab.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 78, 632-634. [[PubMed](#)]
128. Zaraa I, Sellami A, Bouguerra C, Sellami MK, Chelly I, Zitouna M, Makni S, Hmida AB, Mokni M, Osman AB, 2011. **Pemphigus vegetans: a clinical, histological, immunopathological and prognostic study.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25, 1160-1167. [[PubMed](#)]
129. Danopoulou I, Stavropoulos P, Stratigos A, Chatziolou E, Chiou A, Georgala S, Katsambas A, 2006. **Pemphigus vegetans confined to the scalp.** *International journal of dermatology* 45, 1008-1009. [[PubMed](#)]
130. Torok L, Husz S, Ocsai H, Krischner A, Kiss M, 2003. **Pemphigus vegetans presenting as acrodermatitis continua suppurativa.** *Eur J Dermatol* 13, 579-581. [[PubMed](#)]
131. Abida O, Kallel-Sellami M, Joly P, Ben Ayed M, Zitouni M, Masmoudi A, Mokni M, Fezzaa B, Ben Osman A, Kammoun MR *et al*, 2009. **Anti-desmoglein 1 antibodies in healthy related and unrelated subjects and patients with pemphigus foliaceus in endemic and non-endemic areas from Tunisia.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23, 1073-1078. [[PubMed](#)]

132. Perez-Perez ME, Avalos-Diaz E, Herrera-Esparza R, 2012. **Autoantibodies in senear-usher syndrome: cross-reactivity or multiple autoimmunity?** *Autoimmune Dis* 2012, 296214. [[PubMed](#)]
133. Tsuruta D, Ishii N, Hamada T, Ohyama B, Fukuda S, Koga H, Imamura K, Kobayashi H, Karashima T, Nakama T *et al*, 2011. **IgA pemphigus.** *Clin Dermatol* 29, 437-442. [[PubMed](#)]
134. Tajima M, Mitsuhashi Y, Irisawa R, Amagai M, Hashimoto T, Tsuboi R, 2010. **IgA pemphigus reacting exclusively to desmoglein 3.** *Eur J Dermatol* 20, 626-629. [[PubMed](#)]
135. Czernik A, Camilleri M, Pittelkow MR, Grando SA, 2011. **Paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome: 20 years after.** *International journal of dermatology* 50, 905-914. [[PubMed](#)]
136. Jukic IL, Marinovic B, 2011. **Significance of immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses.** *Clin Dermatol* 29, 389-397. [[PubMed](#)]
137. Mimouni D, Anhalt GJ, Lazarova Z, Aho S, Kazerounian S, Kouba DJ, Mascaro JM, Jr., Nousari HC, 2002. **Paraneoplastic pemphigus in children and adolescents.** *Br J Dermatol* 147, 725-732. [[PubMed](#)]
138. Rados J, 2011. **Autoimmune blistering diseases: histologic meaning.** *Clin Dermatol* 29, 377-388. [[PubMed](#)]
139. Anuradha C, Malathi N, Anandan S, Magesh K, 2011. **Current concepts of immunofluorescence in oral mucocutaneous diseases.** *J Oral Maxillofac Pathol* 15, 261-266. [[PubMed](#)]
140. Aoki V, Sousa JX, Jr., Fukumori LM, Perigo AM, Freitas EL, Oliveira ZN, 2010. **Direct and indirect immunofluorescence.** *An Bras Dermatol* 85, 490-500. [[PubMed](#)]
141. Lebe B, Gul Niflioglu G, Seyrek S, Ellidokuz H, 2012. **Evaluation of clinical and histopathologic/direct immunofluorescence diagnosis in autoimmune vesicobullous dermatitis: utility of direct immunofluorescence.** *Turk Patoloji Derg* 28, 11-16. [[PubMed](#)]
142. Hashimoto T, 2001. **Immunopathology of paraneoplastic pemphigus.** *Clin Dermatol* 19, 675-682. [[PubMed](#)]
143. Durdu M, Baba M, Seckin D, 2008. **The value of Tzanck smear test in diagnosis of erosive, vesicular, bullous, and pustular skin lesions.** *J Am Acad Dermatol* 59, 958-964. [[PubMed](#)]
144. Aithal V, Kini U, Jayaseelan E, 2007. **Role of direct immunofluorescence on Tzanck smears in pemphigus vulgaris.** *Diagn Cytopathol* 35, 403-407. [[PubMed](#)]
145. Daneshpazhooh M, Asgari M, Naraghi ZS, Barzgar MR, Akhyani M, Balighi K, Chams-Davatchi C, 2009. **A study on plucked hair as a substrate for direct immunofluorescence in pemphigus vulgaris.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23, 129-131. [[PubMed](#)]
146. Rao R, Dasari K, Shenoi S, Balachandran C, 2009. **Demonstration of pemphigus-specific immunofluorescence pattern by direct immunofluorescence of plucked hair.** *International journal of dermatology* 48, 1187-1189. [[PubMed](#)]

147. Lehman JS, Camilleri MJ, 2013. **Diagnostic utility of direct immunofluorescence findings around hair follicles and sweat glands in immunobullous disease.** *J Cutan Pathol* 40, 230-235. [[PubMed](#)]
148. Tanasilovic S, Medenica L, Popadic S, 2014. **Direct immunofluorescence of the outer root sheath in anagen and telogen hair in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus.** *The Australasian journal of dermatology* 55, e74-76. [[PubMed](#)]
149. Balighi K, Taheri A, Mansoori P, Chams C, 2006. **Value of direct immunofluorescence in predicting remission in pemphigus vulgaris.** *International journal of dermatology* 45, 1308-1311. [[PubMed](#)]
150. Daneshpazhooh M, Naraghi ZS, Ramezani A, Ghanadan A, Esmaili N, Chams-Davatchi C, 2011. **Direct immunofluorescence of plucked hair for evaluation of immunologic remission in pemphigus vulgaris.** *J Am Acad Dermatol* 65, e173-177. [[PubMed](#)]
151. Aksu D, Peksari Y, Arica IE, Gurgey E, 2010. **Assessing the autoantibody levels in relation to disease severity and therapy response in pemphigus patients.** *Indian J Dermatol* 55, 342-347. [[PubMed](#)]
152. Ortolan DG, Souza DP, Aoki V, Santi CG, Gabbi TV, Ichimura LM, Maruta CW, 2011. **Analysis of the reactivity of indirect immunofluorescence in patients with pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris using rat bladder epithelium as a substrate.** *Clinics (Sao Paulo)* 66, 2019-2023. [[PubMed](#)]
153. Narbutt J, Boncela J, Smolarczyk K, Kowalewski C, Wozniak K, Torzecka JD, Sysa-Jedrzejowska A, Cierniewski CS, Lesiak A, 2012. **Pathogenic activity of circulating anti-desmoglein-3 autoantibodies isolated from pemphigus vulgaris patients.** *Arch Med Sci* 8, 347-356. [[PubMed](#)]
154. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM, 2001. **The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels.** *Br J Dermatol* 144, 775-780. [[PubMed](#)]
155. Kavala M, Kocaturk OE, Demirkesen C, Can B, Zindanci I, Turkoglu Z, 2007. **Detection of pemphigus autoantibodies in healthy relatives of Turkish patients with pemphigus.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73, 240-242. [[PubMed](#)]
156. Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, Milner Y, 2000. **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* 143, 337-342. [[PubMed](#)]
157. Torzecka JD, Wozniak K, Kowalewski C, Waszczykowska E, Sysa-Jedrzejowska A, Pas HH, Narbutt J, 2007. **Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development?** *Archives of dermatological research* 299, 239-243. [[PubMed](#)]
158. Lenz P, Amagai M, Volc-Platzer B, Stingl G, Kirnbauer R, 1999. **Desmoglein 3-ELISA: a pemphigus vulgaris-specific diagnostic tool.** *Arch Dermatol* 135, 143-148. [[PubMed](#)]
159. Khandpur S, Sharma VK, Sharma A, Pathria G, Satyam A, 2010. **Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay test with immunoblot assay in the diagnosis of pemphigus in Indian patients.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 76, 27-32. [[PubMed](#)]

160. Mortazavi H, Shahdi M, Amirzargar AA, Naraghi ZS, Valikhani M, Daneshpazhooh M, Vasheghani-Farahani A, Sedaghat M, Chams-Davatchi C, 2009. **Desmoglein ELISA in the diagnosis of pemphigus and its correlation with the severity of pemphigus vulgaris.** *Iran J Allergy Asthma Immunol* 8, 53-56. [[PubMed](#)]
161. Herrero-Gonzalez JE, Mascaro JM, Jr., Iranzo P, Herrero C, 2006. **Atypical pemphigus: discordance between clinicopathological findings and the antigenic profile in four cases.** *J Cutan Pathol* 33, 502-507. [[PubMed](#)]
162. Parmar NV, Kanwar AJ, Minz RW, Parsad D, Vinay K, Tsuruta D, Ishii N, Hashimoto T, 2013. **Assessment of the therapeutic benefit of dexamethasone cyclophosphamide pulse versus only oral cyclophosphamide in phase II of the dexamethasone cyclophosphamide pulse therapy: a preliminary prospective randomized controlled study.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 79, 70-76. [[PubMed](#)]
163. Pas HH, 2001. **Immunoblot assay in differential diagnosis of autoimmune blistering skin diseases.** *Clin Dermatol* 19, 622-630. [[PubMed](#)]
164. Mihalyi L, Kiss M, Dobozy A, Kemeny L, Husz S, 2012. **Clinical relevance of autoantibodies in patients with autoimmune bullous dermatosis.** *Clin Dev Immunol* 2012, 369546. [[PubMed](#)]
165. Muller R, Heber B, Hashimoto T, Messer G, Mullegger R, Niedermeier A, Hertl M, 2009. **Autoantibodies against desmocollins in European patients with pemphigus.** *Clin Exp Dermatol* 34, 898-903. [[PubMed](#)]
166. Watanabe T, Kato M, Yoshida Y, Fukuda S, Hashimoto T, Yamamoto O, 2011. **Mucocutaneous-type pemphigus vulgaris with anti-desmoplakin autoantibodies.** *Eur J Dermatol* 21, 299-300. [[PubMed](#)]
167. Nagata Y, Karashima T, Watt FM, Salmhofer W, Kanzaki T, Hashimoto T, 2001. **Paraneoplastic pemphigus sera react strongly with multiple epitopes on the various regions of envoplakin and periplakin, except for the c-terminal homologous domain of periplakin.** *The Journal of investigative dermatology* 116, 556-563. [[PubMed](#)]
168. Mimouni D, Foedinger D, Kouba DJ, Orlow SJ, Rappersberger K, Sciubba JJ, Nikolskaia OV, Cohen BA, Anhalt GJ, Nousari CH, 2004. **Mucosal dominant pemphigus vulgaris with anti-desmoplakin autoantibodies.** *J Am Acad Dermatol* 51, 62-67. [[PubMed](#)]
169. Alarcon-Torres I, Bastida-Inarrea J, Rodriguez-Salido MJ, Gomez-Duaso J, Rua-Figueroa I, Garcia-Aguilar GD, Martin-Alfaro R, 2007. **Paraneoplastic pemphigus associated with Castleman's disease: usefulness of the laboratory of autoimmunity in the diagnosis of this disease.** *Ann N Y Acad Sci* 1107, 231-238. [[PubMed](#)]
170. Anhalt GJ, 1999. **Making sense of antigens and antibodies in pemphigus.** *J Am Acad Dermatol* 40, 763-766. [[PubMed](#)]
171. de Bruin A, Muller E, Wyder M, Anhalt GJ, Lemmens P, Suter MM, 1999. **Periplakin and envoplakin are target antigens in canine and human paraneoplastic pemphigus.** *J Am Acad Dermatol* 40, 682-685. [[PubMed](#)]

172. Nikolskaia OV, Nousari CH, Anhalt GJ, 2003. **Paraneoplastic pemphigus in association with Castleman's disease.** *Br J Dermatol* 149, 1143-1151. [[PubMed](#)]
173. Cozzani E, Dal Bello MG, Mastrogioacomo A, Drosera M, Parodi A, 2006. **Antidesmoplakin antibodies in pemphigus vulgaris.** *Br J Dermatol* 154, 624-628. [[PubMed](#)]
174. Park GT, Lee JH, Yun SJ, Lee SC, Lee JB, 2007. **Paraneoplastic pemphigus without an underlying neoplasm.** *Br J Dermatol* 156, 563-566. [[PubMed](#)]
175. Agarwal M, Walia R, Kochhar AM, Chander R, 1998. **Pemphigus Area and Activity Score (PAAS)--a novel clinical scoring method for monitoring of pemphigus vulgaris patients.** *International journal of dermatology* 37, 158-160. [[PubMed](#)]
176. Daniel BS, Hertl M, Werth VP, Eming R, Murrell DF, 2012. **Severity score indexes for blistering diseases.** *Clin Dermatol* 30, 108-113. [[PubMed](#)]
177. Grover S, 2011. **Scoring systems in pemphigus.** *Indian J Dermatol* 56, 145-149. [[PubMed](#)]
178. Pfütze M, Niedermeier A, Hertl M, Eming R, 2007. **Introducing a novel Autoimmune Bullous Skin Disorder Intensity Score (ABSIS) in pemphigus.** *Eur J Dermatol* 17, 4-11. [[PubMed](#)]
179. Rosenbach M, Murrell DF, Bystryń JC, Dulay S, Dick S, Fakharzadeh S, Hall R, Korman NJ, Lin J, Okawa J *et al*, 2009. **Reliability and convergent validity of two outcome instruments for pemphigus.** *The Journal of investigative dermatology* 129, 2404-2410. [[PubMed](#)]
180. Ruocco E, Wolf R, Ruocco V, Brunetti G, Romano F, Lo Schiavo A, 2013. **Pemphigus: associations and management guidelines: facts and controversies.** *Clin Dermatol* 31, 382-390. [[PubMed](#)]
181. Ljubojević S, Lipozencić J, 2012. **Autoimmune bullous diseases associations.** *Clin Dermatol* 30, 17-33. [[PubMed](#)]
182. Iino Y, Hara H, Suda T, Okada T, Baba S, Suzuki H, 2005. **Co-existence of pemphigus vulgaris and Hashimoto's thyroiditis.** *Eur J Dermatol* 15, 40-42. [[PubMed](#)]
183. Leshem YA, Katzenelson V, Yosipovitch G, David M, Mimouni D, 2011. **Autoimmune diseases in patients with pemphigus and their first-degree relatives.** *International journal of dermatology* 50, 827-831. [[PubMed](#)]
184. Kavala M, Kural E, Kocaturk E, Zindancı I, Turkoglu Z, Can B, 2012. **The evaluation of thyroid diseases in patients with pemphigus vulgaris.** *ScientificWorldJournal* 2012, 146897. [[PubMed](#)]
185. Daneshpazhooh M, Moeineddin F, Kiani A, Naraghi ZS, Firooz A, Akhyani M, Chams-Davatchi C, 2012. **Fatal paraneoplastic pemphigus after removal of Castleman's disease in a child.** *Pediatr Dermatol* 29, 656-657. [[PubMed](#)]
186. Toth GG, Jonkman MF, 2001. **Therapy of pemphigus.** *Clin Dermatol* 19, 761-767. [[PubMed](#)]
187. Vyas N, Patel NS, Cohen GF, 2013. **Mycophenolate mofetil as a first-line steroid-sparing agent in the treatment of pemphigus vulgaris.** *J Drugs Dermatol* 12, 210-216. [[PubMed](#)]

188. Lyakhovitsky A, Baum S, Scope A, Amichai B, Barzilai A, Rimer J, Trau H, 2011. **The impact of stratifying initial dose of corticosteroids by severity of pemphigus vulgaris on long-term disease severity.** *International journal of dermatology* 50, 1014-1019. [[PubMed](#)]
189. Kasperkiewicz M, Schmidt E, Zillikens D, 2012. **Current therapy of the pemphigus group.** *Clin Dermatol* 30, 84-94. [[PubMed](#)]
190. Kanwar AJ, Vinay K, 2012. **Rituximab in pemphigus.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 78, 671-676. [[PubMed](#)]
191. Meurer M, 2012. **Immunosuppressive therapy for autoimmune bullous diseases.** *Clin Dermatol* 30, 78-83. [[PubMed](#)]
192. Yeh SW, Sami N, Ahmed RA, 2005. **Treatment of pemphigus vulgaris: current and emerging options.** *Am J Clin Dermatol* 6, 327-342. [[PubMed](#)]
193. Dick SE, Werth VP, 2006. **Pemphigus: a treatment update.** *Autoimmunity* 39, 591-599. [[PubMed](#)]
194. Fiorentino DF, Garcia MS, Rehmus W, Kimball AB, 2011. **A pilot study of etanercept treatment for pemphigus vulgaris.** *Arch Dermatol* 147, 117-118. [[PubMed](#)]
195. Mao X, Payne AS, 2008. **Seeking approval: present and future therapies for pemphigus vulgaris.** *Curr Opin Investig Drugs* 9, 497-504. [[PubMed](#)]
196. el-Darouti M, Marzouk S, Abdel Hay R, el-Tawdy A, Fawzy M, Leheta T, Gammaz H, Al Gendy N, 2009. **The use of sulfasalazine and pentoxifylline (low-cost antitumour necrosis factor drugs) as adjuvant therapy for the treatment of pemphigus vulgaris: a comparative study.** *Br J Dermatol* 161, 313-319. [[PubMed](#)]
197. Ahmed AR, Gurcan HM, 2011. **Use of intravenous immunoglobulin therapy during pregnancy in patients with pemphigus vulgaris.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25, 1073-1079. [[PubMed](#)]
198. Eming R, Hertl M, 2006. **Immunoabsorption in pemphigus.** *Autoimmunity* 39, 609-616. [[PubMed](#)]
199. Gurcan HM, Ahmed AR, 2009. **Efficacy of dapsone in the treatment of pemphigus and pemphigoid: analysis of current data.** *Am J Clin Dermatol* 10, 383-396. [[PubMed](#)]
200. Hashimoto T, 2001. **Immunopathology of IgA pemphigus.** *Clin Dermatol* 19, 683-689. [[PubMed](#)]
201. Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. **Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis.** *Evolutionary bioinformatics online* 1, 47-50. [[PubMed](#)]
202. Murrell DF, Dick S, Ahmed AR, Amagai M, Barnadas MA, Borradori L, Bystryjn JC, Cianchini G, Diaz L, Fivenson D *et al*, 2008. **Consensus statement on definitions of disease, end points, and therapeutic response for pemphigus.** *J Am Acad Dermatol* 58, 1043-1046. [[PubMed](#)]
203. Lee CW, Yang HY, Kim SC, Jung JH, Hwang JJ, 1998. **HLA class II allele associations in Korean patients with pemphigus.** *Dermatology* 197, 349-352. [[PubMed](#)]

204. Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas AI, Rehman SB, Khan AA, Ahmad M, Alper CA, Ahmed AR *et al*, 1997. **Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients.** *Hum Immunol* 57, 110-119. [[PubMed](#)]
205. Miyagawa S, Higashimine I, Iida T, Yamashina Y, Fukumoto T, Shirai T, 1997. **HLA-DRB1*04 and DRB1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese.** *The Journal of investigative dermatology* 109, 615-618. [[PubMed](#)]
206. Zivanovic D, Bojic S, Medenica L, Andric Z, Popadic D, 2016. **Human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles and haplotypes frequencies in patients with pemphigus vulgaris among the Serbian population.** *Hla* 87, 367-374.
207. Saenz-Cantele AM, Fernandez-Mestre M, Montagnani S, Calebotta A, Balbas O, Layrisse Z, 2007. **HLA-DRB1*0402 haplotypes without DQB1*0302 in Venezuelan patients with pemphigus vulgaris.** *Tissue antigens* 69, 318-325. [[PubMed](#)]
208. Gonzalez-Escribano MF, Jimenez G, Walter K, Montes M, Perez-Bernal AM, Rodriguez MR, Conejo-Mir JS, Nunez-Roldan A, 1998. **Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris.** *Tissue antigens* 52, 275-278. [[PubMed](#)]
209. Glorio R, Rodriguez Costa G, Haas R, Gruber M, Fainboim L, Woscoff A, 2002. **HLA haplotypes and class II molecular alleles in Argentinian patients with pemphigus vulgaris.** *Journal of cutaneous medicine and surgery* 6, 422-426. [[PubMed](#)]
210. Harfouch E, Daoud S, 2014. **Allelic variation in HLA-DRB1* loci in Syrian pemphigus vulgaris patients.** *International journal of dermatology* 53, 1460-1463. [[PubMed](#)]
211. Haase O, Alneebari R, Eldarouti MA, Abd El Hady M, Dorgham D, El-Nabarawy E, El Din Mahmoud SB, Mosaad El Sayed H, Darwish M, Abbas F *et al*, 2015. **Association with HLA-DRB1 in Egyptian and German pemphigus vulgaris patients.** *Tissue antigens* 85, 283-286. [[PubMed](#)]
212. Weber R, Monteiro F, Preuhs-Filho G, Rodrigues H, Kalil J, Miziara ID, 2011. **HLA-DRB1*04:02, DRB1*08:04 and DRB1*14 alleles associated to pemphigus vulgaris in southeastern Brazilian population.** *Tissue antigens* 78, 92-93. [[PubMed](#)]
213. Koc CK, Sallakci N, Akman-Karakas A, Alpsoy E, Yegin O, 2013. **Human leukocyte antigens class I and class II in patients with pemphigus in southern Turkey.** *International journal of dermatology* 52, 53-58. [[PubMed](#)]
214. Brick C, Belgnaoui FZ, Atouf O, Aoussar A, Bennani N, Senouci K, Hassam B, Essakalli M, 2007. **Pemphigus and HLA in Morocco.** *Transfus Clin Biol* 14, 402-406. [[PubMed](#)]
215. Ljubojevic S, Lipozencic J, Brenner S, Budimcic D, 2002. **Pemphigus vulgaris: a review of treatment over a 19-year period.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16, 599-603. [[PubMed](#)]
216. Starzycki Z, Chorzelski TP, Jablonska S, 1998. **Familial pemphigus vulgaris in mother and daughter.** *International journal of dermatology* 37, 211-214. [[PubMed](#)]

217. Yamamoto T, Ikeda K, Sasaoka S, Yamasaki O, Fujimoto W, Aoyama Y, Iwatsuki K, 2011. **Human leukocyte antigen genotypes and antibody profiles associated with familial pemphigus in Japanese.** *The Journal of dermatology* 38, 711-716. [[PubMed](#)]
218. Bhol K, Yunis J, Ahmed AR, 1996. **Pemphigus vulgaris in distant relatives of two families: association with major histocompatibility complex class II genes.** *Clin Exp Dermatol* 21, 100-103. [[PubMed](#)]
219. Fridkis-Hareli M, 2006. **Distribution Of Jewish And Non-Jewish Haplotypes Among Pemphigus Vulgaris Patients Worldwide.** *Internet Journal of Dermatology* 6, 1-18.
220. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ, 1991. **Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5056-5060. [[PubMed](#)]
221. Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Yunis JJ, Delgado JC, Yunis DE, Firooz A, Dowlati Y, Bahar K, Gregersen PK *et al*, 1997. **Identical MHC markers in non-Jewish Iranian and Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris: possible common central Asian ancestral origin.** *Hum Immunol* 57, 62-67. [[PubMed](#)]
222. Slomov E, Loewenthal R, Goldberg I, Korostishevsky M, Brenner S, Gazit E, 2003. **Pemphigus vulgaris in Jewish patients is associated with HLA-A region genes: mapping by microsatellite markers.** *Hum Immunol* 64, 771-779. [[PubMed](#)]
223. Niizeki H, Inoko H, Mizuki N, Inamoto N, Watababe K, Hashimoto T, Nishikawa T, 1994. **HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR-RFLP method.** *Tissue antigens* 44, 248-251. [[PubMed](#)]
224. Zakka LR, Keskin DB, Reche P, Ahmed AR, 2010. **Relationship between target antigens and major histocompatibility complex (MHC) class II genes in producing two pathogenic antibodies simultaneously.** *Clinical and experimental immunology* 162, 224-236. [[PubMed](#)]
225. Veldman CM, Gebhard KL, Uter W, Wassmuth R, Grotzinger J, Schultz E, Hertl M, 2004. **T cell recognition of desmoglein 3 peptides in patients with pemphigus vulgaris and healthy individuals.** *Journal of immunology* 172, 3883-3892. [[PubMed](#)]
226. Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, Nishikawa T, Shirai T, Inoko H, 1999. **HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus.** *Tissue antigens* 54, 333-340. [[PubMed](#)]
227. Cozzani E, Di Zenzo G, Riva S, Calabresi V, Sera F, Drosera M, Parodi A, 2013. **Are clinical phenotype and autoantibody profile always concordant in pemphigus? A study in a cohort of pemphigus patients.** *Eur J Dermatol* 23, 40-48. [[PubMed](#)]
228. Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, Khamesipour A, Mansoori P, Taheri A, Firooz A, Mortazavi H, Esmaili N, Dowlati Y, 2007. **Desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in Iranian patients with pemphigus vulgaris: correlation with phenotype, severity, and disease activity.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21, 1319-1324. [[PubMed](#)]

229. Daneshpazhooh M, Kamyab K, Kalantari MS, Balighi K, Naraghi ZS, Shamohammadi S, Mortazavizadeh SM, Ramezani A, Chams-Davatchi C, 2014. **Comparison of desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay and direct immunofluorescence for evaluation of immunological remission in pemphigus vulgaris.** *Clin Exp Dermatol* 39, 41-47. [[PubMed](#)]
230. Hallaji Z, Mortazavi H, Lajevardi V, Tamizifar B, AmirZargar A, Daneshpazhooh M, Chams-Davatchi C, 2010. **Serum and salivary desmoglein 1 and 3 enzyme-linked immunosorbent assay in pemphigus vulgaris: correlation with phenotype and severity.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24, 275-280. [[PubMed](#)]
231. Jamora MJ, Jiao D, Bystryjn JC, 2003. **Antibodies to desmoglein 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris.** *J Am Acad Dermatol* 48, 976-977. [[PubMed](#)]
232. Zagorodniuk I, Weltfriend S, Shtruminger L, Sprecher E, Kogan O, Pollack S, Bergman R, 2005. **A comparison of anti-desmoglein antibodies and indirect immunofluorescence in the serodiagnosis of pemphigus vulgaris.** *International journal of dermatology* 44, 541-544. [[PubMed](#)]
233. Koga H, Ohyama B, Tsuruta D, Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Natsuaki Y, Sogame R, Fukuda S, Karashima T *et al*, 2012. **Five Japanese cases of antidesmoglein 1 antibody-positive and antidesmoglein 3 antibody-negative pemphigus with oral lesions.** *Br J Dermatol* 166, 976-980. [[PubMed](#)]
234. Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, Wojnarowska F, Stevens SR, Chen M, Fairley JA *et al*, 1998. **Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases.** *The Journal of investigative dermatology* 110, 103-109. [[PubMed](#)]
235. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T, 1999. **Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus.** *Br J Dermatol* 140, 351-357. [[PubMed](#)]
236. Belloni-Fortina A, Faggion D, Pigozzi B, Peserico A, Bordignon M, Baldo V, Alaibac M, 2009. **Detection of autoantibodies against recombinant desmoglein 1 and 3 molecules in patients with pemphigus vulgaris: correlation with disease extent at the time of diagnosis and during follow-up.** *Clin Dev Immunol* 2009, 187864. [[PubMed](#)]
237. Avgerinou G, Papafragkaki DK, Nasiopoulou A, Markantoni V, Arapaki A, Servitzoglou M, Katsambas A, Stavropoulos PG, 2013. **Correlation of antibodies against desmogleins 1 and 3 with indirect immunofluorescence and disease status in a Greek population with pemphigus vulgaris.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27, 430-435. [[PubMed](#)]
238. Sharma VK, Prasad HR, Khandpur S, Kumar A, 2006. **Evaluation of desmoglein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Indian patients with pemphigus vulgaris.** *International journal of dermatology* 45, 518-522. [[PubMed](#)]
239. Harman KE, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM, 2000. **A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences in frequency and the association with a more severe phenotype.** *Br J Dermatol* 143, 343-348. [[PubMed](#)]

240. Schmidt E, Zillikens D, 2010. **Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases.** *Autoimmun Rev* 10, 84-89. [[PubMed](#)]
241. Patsatsi A, Kyriakou A, Giannakou A, Pavlitou-Tsiontsi A, Lambropoulos A, Sotiriadis D, 2014. **Clinical significance of anti-desmoglein-1 and -3 circulating autoantibodies in Pemphigus Patients Measured by Area Index and Intensity Score.** *Acta Derm Venereol* 94, 203-206. [[PubMed](#)]
242. Weiss D, Ristl R, Griss J, Bangert C, Foedinger D, Stingl G, Brunner PM, 2015. **Autoantibody Levels and Clinical Disease Severity in Patients with Pemphigus: Comparison of Aggregated Anti-desmoglein ELISA Values and Indirect Immunofluorescence Titres.** *Acta Derm Venereol* 95, 559-564. [[PubMed](#)]
243. Kumar B, Arora S, Kumaran MS, Jain R, Dogra S, 2006. **Study of desmoglein 1 and 3 antibody levels in relation to disease severity in Indian patients with pemphigus.** *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 72, 203-206. [[PubMed](#)]
244. Cheng SW, Kobayashi M, Kinoshita-Kuroda K, Tanikawa A, Amagai M, Nishikawa T, 2002. **Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3.** *Br J Dermatol* 147, 261-265. [[PubMed](#)]
245. Beutner EH, Chorzelski TP, Jablonska S, 1985. **Immunofluorescence tests. Clinical significance of sera and skin in bullous diseases.** *International journal of dermatology* 24, 405-421. [[PubMed](#)]
246. Acosta E, Gilkes JJ, Ivanyi L, 1985. **Relationship between the serum autoantibody titers and the clinical activity of pemphigus vulgaris.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 60, 611-614. [[PubMed](#)]
247. Harman KE, 2002. **New laboratory techniques for the assessment of acquired immunobullous disorders.** *Clin Exp Dermatol* 27, 40-46. [[PubMed](#)]
248. Jiao D, Bystryjn JC, 1997. **Sensitivity of indirect immunofluorescence, substrate specificity, and immunoblotting in the diagnosis of pemphigus.** *J Am Acad Dermatol* 37, 211-216. [[PubMed](#)]
249. Mortazavi H, Kiavash K, Esmaili N, Chams-Davatchi C, 2008. **Correlation of pemphigus vulgaris antibody titers by indirect immunofluorescence with activity of disease based on pemphigus area and activity score (PAAS).** *Acta medica Iranica* 46, 239-244. [[Link](#)]
250. Svecova D, Parnicka Z, Pastyrikova L, Urbancek S, Luha J, Buc M, 2015. **HLA DRB1* and DQB1* alleles are associated with disease severity in patients with pemphigus vulgaris.** *International journal of dermatology* 54, 168-173. [[PubMed](#)]

Skraćenice

PV- pemfigus vulgaris

PF- pemfigus foliaceus

HLA- humani leukocitni antigeni

MHC- glavni kompleks tkivne podudarnosti

Dsg3- Dezmogleni 3

Dsg1- Dezmoglein 1

Dsc- Dezmokolin

APĆ- antigen prezentujuće ćelije

IIF- indirektni imunofluorescentni test

DIF- direktni imunofluorescentni test

ELISA- *engl.* Enzyme - linked immunosorbent assay

PDAI- (*engl.* Pemhigus disease activity index) stepen aktivnosti bolesti

PCR- (*engl.* Polymerase chain reaction) reakcija lančanog umnožavanja DNK)

SSP- (*engl.* Polymerase chain reaction with sequence-specific primers, PCR-SSP) prajmeri specifični za sekvencu

PCR-SSOP- (*engl.* Polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide probes) oligonukleotidne probe specifične za sekvencu

LD- (*engl.* Linkage disequilibrium), neravnoteža udruživanja alela

MCP- mukokutani pemfigus vulgaris

PM- pemfigus mukoza

Prilog 1.

Pemphigus Disease Area Index (PDAI)

Skin	Activity	Damage
Anatomical Location	Erosion/blisters or new erythema	Post-inflammatory hyperpigmentation or erythema from resolving lesion
	0 absent 1 1-3 lesions, up to one >2 cm diameter, none > 6 cm 2 2-3 lesions, at least two > 2 cm diameter, none > 6cm 3 >3 lesions, none > 6 cm diameter 5 >3 lesions, and/or at least one >6 cm diameter 10 >3 lesions, and/or at least one lesion >16 cm diameter or entire area	0 absent 1 present
Ears		
Nose		
Rest of the face		
Neck		
Chest		
Abdomen		
Back, buttocks		
Arms		
Hands		
Legs		
Feet		
Genitals		
Total skin	/120	/12

Scalp

Scalp	Erosion/blisters or new erythema	Post-inflammatory hyperpigmentation or erythema from resolving lesion
	0 absent 1 in one quadrant 2 two quadrants 3 three quadrants 4 affects whole skull 10 at least one lesion > 6 cm	0 absent 1 present
Total Scalp (0-10)	/10	/1

Mucous membrane

Anatomical Location	Erosion/Blisters
	0 absent 1 1 lesion 2 2-3 lesions 5 >3 lesions or 2 lesions >2 cm 10 entire area
Eyes	
Nose	
Buccal mucosa	
Hard palate	
Soft palate	
Upper gingiva	
Lower gingiva	
Tongue	
Floor of mouth	
Labial bucosa	
Posterior pharynx	
Anogenital	
Total Mucosa	/120

Total Activity Score:

Total Damage Score

Prilog 2.

Table 2 PAAS for mucus membrane lesions alone

Markers	Clinical scores			
	0	1	2	3
Area	Nil	1 Site	2 Sites	>2 Sites
Severity	Nil	Mild	Moderate	Severe

Mucus membrane score (MM) = area score + severity score.

Total score = cutaneous score + MM score.

Table 1 Pemphigus Area and Activity Score (PAAS) for cutaneous lesions

Clinical markers	Clinical scores						
	0	1	2	3	4	5	6
A: Activity							
(a) No. of new blisters/day	0	1-5	6-10	11-20	>20	-	-
(b) Peripheral extension of existing blisters	nil	mild	moderate	extensive	-	-	-
(c) Nikolsky's sign	-ve	perilesional	distant	-	-	-	-
B: Area (%)	nil	0-15	16-30	31-50	51-70	71-90	>90

Head score (H) = [(a + b + c) × score of area] × 0.1.

Trunk score (T) = [(a + b + c) × score of area] × 0.3.

Upper limbs score (UL) = [(a + b + c) × score of area] × 0.2.

Lower limbs score (LL) = [(a + b + c) × score of area] × 0.4.

Total cutaneous score + H + T + UL + LL.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Dubravka Živanović rođena je u Maroku, 1970. godine. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 1995. godine sa prosečnom ocenom 9,48. Na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2005. godine odbranila je magistarsku tezu pod nazivom "Pulsna terapija pemfigus vulgarisa - evaluacija efekata".

Specijalistički staž iz dermatovenerologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu obavila je od 1997. do 2000. godine, kada je položila specijalistički ispit. Zaposlena je u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije od 2000. godine. Od 2007. do 2013. godine radila je kao asistent pri Katedri dermatovenerologije Medicinskog fakulteta u Beogradu, a od 2016. godine zaposlena je kao klinički asistent pri istoj Katedri.

Autor je ili koautor 5 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u JCR (Journal Citation Reports) listi i radova publikovanih u domaćim i stranim časopisima i zbornicima radova. Dr Živanović bila je saradnik na projektu Ministarstva za nauku i životnu sredinu Republike Srbije od 2011. godine.

Član je Dermatovenerološke sekcije Srpskog lekarskog društva i Evropske Akademije za Dermatovenerologiju,

Govori engleski i francuski jezik.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a **Dubravka Živanović**

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

POLIMORFIZAM HLA- DR I HLA- DQ ALELA KOD PACIJENATA SA PEMFIGUS VULGARISOM

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.05.2016. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Dubravka Živanović**

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **POLIMORFIZAM HLA- DR I HLA- DQ ALELA KOD PACIJENATA SA
PEMFIGUS VULGARISOM**

Mentor **Prof. dr Ljiljana Medenica**

Komentor **Prof. dr Dušan Popadić**

Potpisani **Dr Dubravka Živanović**

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.05.2016. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

POLIMORFIZAM HLA- DR I HLA- DQ ALELA KOD PACIJENATA SA PEMFIGUS VULGARISOM

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.05.2016. godine

