

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON
BİRİMİ (PAUBAP)

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

PROJE NO: 2009 BSP 016

PROJE TİPİ : Başlangıç Seviyesi

İLGİLİ BİRİM:Tıp Fakültesi**

**PROJE ADI: Pemfigus Etiyopatogenezinde
Coxsackie Virüsün Olası Rolünün Araştırılması**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ :

Yard. Doç. Dr. Nida KAÇAR (TF)

ARAŞTIRMACILAR :

Doç. Dr. Nural CEVAHİR (TF)

Prof. Dr. Neşe ÇALLI DEMİRKAN (TF)

Doç. Dr. Berna ŞANLI ERDOĞAN (TF)

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
(PAUBAP)**

PROJE NO: 2009 BSP 016
PROJE TİPİ : Başlangıç Seviyesi
İLGİLİ BİRİM:Tıp Fakültesi**
PROJE ADI: Pemfigus Etiyopatogenezinde
Coxsackie Virüsün Olası Rolünün
Araştırılması

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:
Yard. Doç. Dr. Nida KAÇAR (TF)

ARAŞTIRMACILAR:
Doç. Dr. Nural CEVAHİR (TF)
Prof. Doç. Dr. Neşe ÇALLI DEMİRKAN (TF)
Doç. Dr. Berna ŞANLI ERDOĞAN (TF)

**Pemfigus Etiyopatogenezinde Coxsackie Virüsün Olası
Rolünün Araştırılması**

Proje No: 2009 BSP 016

Yard. Doç. Dr. Nida KAÇAR
Doç. Dr. Nural CEVAHİR
Prof. Dr. Neşe ÇALLI DEMİRKAN
Doç. Dr. Berna ŞANLI ERDOĞAN

NİSAN 2011
DENİZLİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ ONAY SAYFASI

Yard. Doç. Dr. Nida KAÇAR yürütücülüğünde hazırlanan 2009 BSP 016 nolu ve "Pemfigus Etiyopatogenezinde Cocksackie Virüsün Olası Rolünün Araştırılması" başlıklı Başlangıç Seviyesi Projesi Kesin Sonuç Raporu Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun/....../20.. tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Raşit URHAN

Koordinatör

....../....../20..

ÖNSÖZ

Pemfigus desmozomal proteinlere karşı oluşan antikorlara bağlı gelişen otoimmün büllöz hastalık grubudur. Etiyolojisi tam olarak aydınlanmamış olmakla birlikte viral enfeksiyonlar da suçlanmaktadır. Sunulan çalışmada Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dermatoloji polikliniğine başvuran pemfigus tanılı hastalarda, histopatolojik olarak akantolizin izlendiği başka bir hastalık olan el-ayak-ağız hastalığı etkeni Coxsackie virüslerin, hastalığın seyri sırasında artmış olduğu gösterilmiş çeşitli kemokin ve sitokinler üzerine sahip olduğu arttırıcı etkilerinden yola çıkarak, perilezyonel deri biyopsi materyalinde ve kanda Coxsackie virus varlığı araştırılmıştır. Bu çalışma ile Pemfigus tanılı hastalar ile sağlıklı kontrol olguları Coxsackie virus IgM ve IgG seroprevalansı açısından karşılaştırılmıştır.

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2009BSP016 No.lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
GİRİŞ.....	5
GENEL BİLGİLER.....	7
GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
Olgu seçimi ve materyal toplama.....	10
Kontrol seçimi.....	10
Viral Analiz.....	10
İmmunhistokimyasal inceleme.....	11
RT-PCR.....	11
PCR.....	12
Nested PCR.....	12
Coxsackie virus IgM ve IgG ELİSA çalışması.....	13
İstatistiksel analiz.....	13
BULGULAR.....	14
TARTIŞMA/SONUÇ.....	15
KAYNAKLAR.....	17
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo-1: Cox V nested PCR'da kullanılan primerler	12
--	-----------

KISALTMA VE SEMBOLLER

Ürokinaz tip plazminojen aktivatörü: uPA

İnterlökin : IL

Tümör nekroz faktör: TNF

Human lökosit antijen: HLA

Herpes simpleks virüs: HSV

Varisella zoster virüs: VZV

Ebstein Bar virüs: EBV

Sitomegalovirüs: CMV

Human herpes virüs: HHV

İnsan immünyetmezlik virüsü: HIV

Coxsackie virüs: Cox V

İnterferon: IFN

Klasik akantolitik hastalıklar: KAH

Doku tipi plazminojen aktivatörü: dPA

Plazminojen aktivatörü: PA

Pemfigus Vulgaris-İmmünglobulin G: PV-IgG

Reverse transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu: RT-PCR

Coxsackie Adenovirüs Reseptörü: CAR

ÖZET

Pemfigus Etiyopatogenezinde Coxsackie Virüsün Olası Rolünün Araştırılması

Pemfigus mukozal yüzeyler ve deride epidermal bül biçimlenimi ve akantoliz ile karakterize otoimmün büllöz hastalıklar grubudur. Pemfigus vulgaris'te otoantikörlerin ürokinaz tip plazminojen aktivatörü (uPA) vasıtasıyla plazmin oluşumunu indüklediği ve oluşan plazminin akantolize yol açıyor olabileceği düşünülmektedir. Pemfigus büllerinde IL-1 α ve TNF- α düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır. Anti-uPA, Anti IL-1 α ve Anti TNF- α antikörlerinin in vitro akantolizi belirgin düzeyde baskıladığı da gösterilmiştir.

Pemfigusun etiyopatogenezde birçok virüs araştırılmıştır. Coxsackie virüslerin (Cox V) histopatolojik olarak akantolizin izlendiği bir hastalık olan el-ayak-ağız hastalığının patogenezinde yer alır. Cox V'lerin uPA aktivitesini ve IL-1 α , TNF- α ve IFN- γ düzeylerini arttırdığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Cox V'lerin pemfigus patogenezinde artmış olduğu gösterilmiş sitokinleri arttırıcı etkileri Cox V'lerin pemfigus patogenezinde yer aldığı şüphesini doğurmaktadır.

Bu çalışmada klinik ve histopatolojik inceleme sonucu pemfigus tanısı konmuş hastaların perilezyonel deri biyopsi materyallerinden RT-PCR yöntemi ile Cox V RNA'sı ve immunhistokimyasal inceleme ile Coxsackie Adenovirüs Reseptörü (CAR) ekspresyonu, venöz kan örneğinden de ELİSA ile Cox V IgM ve IgG antikörleri araştırıldı.

Çalışmaya toplam 32 Pemfigus hastası ve 40 kontrol olgusu alındı. On üç hastanın hem kan hem deri örnekleri, 8 hastanın sadece deri örnekleri ve 11 hastanın sadece kan örnekleri incelendi.

Pemfiguslu hastaların perilezyonel deri örneklerinde CAR ekspresyonu ve Cox V-RNA'sı saptanmadı. Tüm hastalarda ve kontrollerde Cox V-IgM antikoru negatifti.

Dört hastada (%12,5) ve iki kontrolde (%5) Cox V-IgG antikorunu pozitif olarak bulundu ($p>0,05$).

Bu sonuçlar viral genomun deride persistan hal alarak etki etmediğine işaret etmektedir. Bununla birlikte Cox V'lerin farklı mekanizmalar ile pemfigus patogeneğinde yer alıp almadığının araştırılması ileri araştırmaların konusu olabilir.

Anahtar kelimeler: pemfigus, enfeksiyon, virüs, Coxsackie virüs, akantoliz, akantolitik hastalık, enterovirüs

ABSTRACT

Investigation of The Possible Role of Coxsackie virus in the Etiopathogenesis of Pemphigus

Pemphigus is a group of autoimmune bullous diseases characterized by epidermal bulla formation in mucosal surfaces and skin. It is thought that auto antibodies induce plasmin by urokinase type plasminogen activator (uPA) and plasmin causes acantholysis in Pemphigus vulgaris. It was established that IL-1 α and TNF- α levels were increased in pemphigus bullae. It was also shown that anti-uPA, anti IL-1 α ve anti TNF- α antibodies suppress in vitro acantholysis prominently.

Several viruses have been searched in the etiopathogenesis of pemphigus. Coxsackie viruses (Cox V) include in the etiopathogenesis of hand-mouth and feet disease in which acantholysis is seen histopathologically. It was established that Cox V induce uPA activity and IL-1 α , TNF- α and IFN- γ levels. The inducing effects of Cox V on the cytokines which increase in pemphigus raise the doubt that Cox V may involve in the pathogenesis of pemphigus.

In the present study perilesional skin biopsy materials of the patients with pemphigus were analyzed for Coxsackie Adenovirus Receptor (CAR) expression with immunohistochemical analyses and for Cox V-RNA with RT-PCR and venous blood samples were analyzed for Cox V-IgM and IgG with ELISA.

Thirty-two patients with pemphigus and 40 controls were included. The blood and skin samples of 13 patients, only the skin samples of 8 patients and only the blood samples of 11 patients were analyzed.

CAR-expression and Cox V-RNA was not determined in the perilesional skin samples of pemphigus patients. Cox V-IgM was negative in all patients and controls. Cox V-IgG was positive in four patients (12.5%) and in two controls (5%) ($p > 0,05$).

These results indicate that viral genome does not act by persisting in skin. However, whether Cox Vs involve in the pathogenesis of pemphigus with different mechanisms may be the topic of further studies.

Keywords: pemphigus, infection, virus, Coxsackie virus, acantholysis, acantholytic disorder, enterovirus

GİRİŞ

Pemfigus mukozal yüzeyler ve deride epidermal bül biçimlenimi ve akantoliz ile karakterize otoimmün büllöz hastalıklar grubudur. Bu hastalıkların temelinde desmoglein 1 ve 3'e karşı otoantikolar yer alır. Bu grup içerisinde pemfigus vulgaris, pemfigus foliaceus, paraneoplastik pemfigus ve IgA pemfigus olmak üzere 4 ana klinik tip vardır.^{1,2} Pemfigus vulgaris'te otoantikoların ürokinaz tip plazminojen aktivatörü (uPA) vasıtasıyla plazmin oluşumunu indüklediği ve oluşan plazminin akantolize yol açıyor olabileceği düşünülmektedir.³ Pemfigus büllerinde interlekin (IL)-1 α ve tümör nekroz faktör (TNF)- α düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır. Anti-uPA, Anti IL- 1 α ve Anti TNF- α antikorlarının in vitro akantolizi belirgin düzeyde baskıladığı da gösterilmiştir.^{4,5}

Pemfigusun predispozan ve indükleyici faktörler arasındaki etkileşim sonucu geliştiği düşünülmektedir. Özellikle human lökosit antijen (HLA) DR4, DR14, DQ1 ve DQ3 olmak üzere bazı HLA tipleri ile güçlü ilişki saptanmıştır. İndükleyici faktörler arasında termal yanık gibi fiziksel travmalar, tümörler, stres, ilaçlar ve enfeksiyonlar yer alır.²

Bakteriyel enfeksiyonlar pemfigusu indükleyen faktör olarak bildirilmemiştir. Etiyopatogenezde birçok virüs suçlanmıştır. Bunlar arasında herpes simpleks virüs (HSV), varisella zoster virüs (VZV), Epstein Bar virüs (EBV), sitomegalovirüs (CMV), human herpes virüs (HHV) 8 ve insan immünyetmezlik virüsü (HIV) yer almaktadır.^{2,6-}

12

Enterovirus ailesine mensup Coxsackie virüsler (Cox V) el-ayak-ağız hastalığı, herpanjina, miyokardit, tip 1 diyabet gibi birçok hastalığın patogenezinde suçlanmaktadır.^{1,13-16} Cox V'ler tarafından indüklenen myokarditlerde akut dönemde uPA aktivitesinde ve ekspresyonunda artış olduğu, akut dönem geçtikten sonra viral

genomik materyalin miyokartta sebat edip IL-1 α ve TNF- α düzeylerini arttırıp çeşitli immuntoksik mekanizmalarla dilate kardiyomyopatiye yol açtığı düşünölmektedir. Viral genomun saptanmadığı dilate kardiyomyopatilerde de miyokarditi tetikleyici bir viral enfeksiyon olasılığı üzerinde durulmaktadır.¹⁶⁻¹⁸ Cox V'lerin periferel kan mononökleer hücrelerinden TNF- α salınımına yol açtığı da gösterilmiştir.¹⁹ Nair ve ark. Tip 1 diyabette Cox V enfeksiyonuna yanıt olarak insülin üreten hücrelerden interferon (IFN)- γ , IFN- α , IFN- β , TNF- α , kemokin (C-X-C motif) ligand 10, kemokin (C-C motif) ligand 5 ve kemokin (C-C motif) ligand 2 mRNA'larının upregüle olduğunu saptamışlar ve bu sitokin ve kemokinlerin indüksiyonunun otoimmün aracılı beta hücre hasarına yol açtığı spekülasyonunu ortaya atmışlardır.¹³

Cox V'lerin uPA aktivitesi ile pemfigus patogeneğinde artmış olduğu gösterilmiş sitokinleri arttırıcı etkileri Pemfigus gibi akantolitik hastalıkların etiyopatogeneğinde rol oynuyor olabileceğini düşündörmektedir.^{3,4,13,17-19} Tüm bu veriler doğrultusunda pemfigusta Cox V varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Epidermal keratinositler birbirlerine desmozom denilen intersellüler köprülerle bağlıdırlar. Desmozomlar, hücrelerarasında bulunan desmoglein ve desmokollin ve hücre içinde sitoplazmik yapışma plağında bulunan desmoplakin glikoproteinlerinden meydana gelmektedir. Bu desmozomal bağlantıların kopması sonucu keratinositler arasındaki bağıllığın ortadan kalkması olarak tanımlanan akantoliz, deride vezikül ve bül kliniğiyle karşımız çıkar. Klasik akantolitik hastalıklar (KAH) arasında Pemfigus grubu hastalıklar ile Hailey-Hailey, Darier ve Grover hastalıkları yer almaktadır.⁵

KAH'lar arasında otoimmün köken sadece Pemfigus grubunda suçlanmaktadır. Klinikte deri ve mukozalarda gevşek büller ve erozyonların izlendiği bu hastalık grubunda akantolizin, desmozomal proteinlere karşı oluşan antikörlara bağı geliştiği gösterilmiştir.^{20,21}

İkisi de keratinositlerden salınan uPA ve doku tipi plazminojen aktivatörü (dPA) olmak üzere iki tip plazminojen aktivatörü (PA) tanımlanmıştır. dPA epitelyal hasarın görüldüğü birçok farklı deri hastalığında eksprese olurken uPA üretimi spesifik olarak Pemfigus Vulgaris-Immunglobulin G (PV-IgG) ile uyarılır. Uyarılan uPA keratinosit yüzeyindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak hücreler arası sıvı ve plazmadaki plazminojeni otokrin bir şekilde aktive eder. Oluşan plazmin spesifik olmayan proteolitik aktivitesi ile desmoglein glikoproteinlerini eritebilmektedir. Bu görüşü destekler şekilde, insan epidermal hücre kültüründe PV antikörları ile uyarılan akantolizin anti-uPA antikörları ve proteaz inhibitörleri ile engellendiği gösterilmiştir. Keratinosit hücre kültürlerine pemfigus otoantikörlarının eklenmesiyle PA salınımının ve proteolitik aktivitenin indüklendiği ve pemfigus antikörlarının keratinositlerin yüzeyindeki PA reseptörlerinin ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. Pemfigus büllerinin sıvısında da proteolitik aktivitenin varlığı ortaya konmuştur.³

Pemfigus büllerinde artmış IL-1 α ve TNF- α düzeyleri saptanmıştır. Feliciani ve ark. IL-1 α ve TNF- α 'nın uPA sentezini uyardığını ve anti-uPA antikoru ile akantolizin baskılandđını ortaya koymuşlardır. Sonuçları doğrultusunda hem IL-1 α ve TNF- α yoluyla uPA sentezinin hem de supra baziller keratinositlerden uPA reseptör ekspresyonunun uyarılarak plazminojenin plazmine dönüşümünün gerçekleştiğini ve PV lezyonlarının bunun sonucunda ortaya çıkan akantolize bağlı gelişiyor olabileceğini düşünmüşlerdir.⁴ Ayrıca Anti IL-1 α ve Anti TNF- α 'nın birlikte in vitro akantolizi %84 oranında inhibe ettiği, ancak akantoliz oluşumunu tamamen baskılayamadđı gösterilmiştir.⁵ Akantolizin, primer olarak desmoglein 1 ve 3 glikoproteinlerinin hücreler arası adheziv fonksiyonunun inhibisyonuna bağlı olduğunu, plazminojen ve kompleman aktivasyonun akantoliz oluşumunda sekonder olarak yer aldığını düşünenler de vardır.³

Pemfigusun etiyolojisi halen bilinmemektedir. Hastalığın aktivasyonunda viral patojenler de suçlanmaktadır. Bir çok virüs araştırılmıştır.⁶⁻¹⁰ Varicella enfeksiyonu sonrası tetiklenen, oral mukozada sınırlı iken varicella enfeksiyonu sonrası gövdeye yayılan ve geirilmif herpangina enfeksiyonu ile beraberinde sefalosporin tedavisi kullanımından iki hafta sonra ortaya çıkan PV olgu bildirileri de bulunmaktadır.^{11,12,22} Dirençli oral pemfigus lezyonlarda yüksek oranda HSV kolonizasyonu saptanmış ve HSV'nin oral pemfigus lezyonlarının iyileşmesini geciktiriyor olabileceği d ş n lm ştir.¹⁰ HHV-8 ile yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilen Kaposi sarkomunun pemfiguslu hastalarda artmış sıklıkta bildirilmesi pemfigus etiyolojisinde HHV-8'in rolünün araştırılmasına yol açmıştır.⁶ çeşitli araştırmacılar tarafından pemfigus vulgaris ve pemfigus foliaceusta, diğer büllöz hastalıklardan ve kontrollerden farklı olarak lezyonel deride HHV-8 DNA sırası tespit edilmiştir.^{7,8}

Sonuçları Wang ve ark.nın daha geniş hasta grubunda yaptıkları araştırmalarıyla da doğrulanmıştır.⁹

Enterovirüsler sıklıkla subklinik veya hafif şiddette enfeksiyonlara yol ačan insan patojenleridir. Bununla birlikte bazı kronik inflamatuvar hastalıkların etiyolojisinde de suçlanmaktadırlar. Enterovirüslerden Cox V'ler histolojik olarak akantolizin izlendiği, oral mukozada veziküllerle seyreden herpanjina ve oral mukozaya ek olarak el ve ayaklarda da veziküllerin görüldüğü el-ayak-aęiz hastalığı etiyolojisinde yer almaktadır.^{1,14} CVB4'ün periferel kan mononükleer hücrelerinden TNF- α salınımına yol aadığı gösterilmiştir.¹⁹ CVB3 tarafından indüklenen miyokarditin 7. gününde uPA aktivitesinde, ekspresyonunda ve IL-1 α ve TNF- α düzeylerinde artış gösterilmiştir.^{17,18} Yüksek IL-1 α ve TNF- α düzeylerinin kronik süreçte de viral genom ile birlikte devamlılığının sürdüğünün saptanması miyokarditin büyük olasılıkla persistan viral enfeksiyon ve ilişkili sitokin salınımı ile tetiklendiğini düşündürmektedir.¹⁸

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı'nda 01.06.2009 ile 31.12.2010 tarihleri arasında yürütüldü. Pamukkale Üniversitesi Etik komitesi tarafından onaylandı.

Olgu seçimi ve materyal toplama

Kliniğimizde hastalık öyküsü, mukoza ve deri bulguları doğrultusunda pemfigus ön tanısı düşünülen hastalardan ön koldan venöz kan örneği ve perilezyonel alandan deri biyopsisi yapıldı. Deri biyopsi materyalinin rutin histopatolojik incelemesinde intraepidermal bül ve/veya akantoliz ve direkt immunfloresan incelemesinde intraepidermal IgG ve/veya C3 birikimi saptanarak Pemfigus tanısı kesinleşen hastalar prospektif şekilde çalışmaya dahil edildi.²³ Bu hastalara ek olarak kliniğimizde çalışma öncesinde takip edilmekte olan pemfigus tanılı diğer hastaların deri biyopsisi parafin blokları da incelemeye alındı. Dış merkezde perilezyonel deri biyopsi materyaline histopatolojik ve direkt immunfloresan inceleme sonucu Pemfigus tanısı konularak biyopsi raporu ile kliniğimize tedavi ve takip için yönlendirilmiş olan hastalardan da venöz kan örneği alındı.

Kontrol seçimi

Kan bankasına kan bağışında bulunmak üzere başvuran sağlıklı gönüllüler ve Dermatoloji polikliniğine inflamatuvar bir deri hastalığı dışında bir şikayet ile (seboreik keratoz, skin tag gibi bening soliter lezyonlar, androgenetik alopesi,...) başvuran hastalar kontrol grubunu oluşturdu. Kontrollerden sadece venöz kan örnekleri alındı.

Viral Analiz

Tüm dokular Cox V açısından hem immunhistokimyasal inceleme hem de reverse transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile test edildi.

İmmunhistokimyasal inceleme

Işık mikroskopik ve direkt immunfloresan inceleme ile pemfigus tanısı konmuş hastaların arşivdeki formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü perilezyonel deri örneklerinde; en uygun dokuyu içeren bloktan dört-beş µm.lik kesitler Superfrost/Plus lamlar üzerine alındı. Slaytlar 50°C'de bir gece etüvde bekletildi. Daha sonra 3 kez 10'ar dakika ksilolde bekletildi. Sonrasında ise sırasıyla 2 dakika absölü alkolda, 2 dakika %95'lik alkolde ve 2 dakika %80'lik alkolde, 2 dakika %70'lik alkolde ve 2 dakika %60'lık alkolde tutularak rehidratasyon yapıldı. Kesitler alkolden çıkarılarak distile suda yıkandı. Daha sonra otomatik yöntemle (Ventana, Benchmark LT) ile immunohistokimyasal aşamalar başlatıldı. Otomatik boyama yapılan kesitlere, primer antikor aşamasında Cocksackie Adenovirüs Reseptörü (CAR) için 1/100 oranında dilüe edilmiş konsantre CAR 72 primer poliklonal antikorla inkübe edilmek üzere otomatik boyama cihazı ile prosedüre devam edildi. Antije retrieval için ph:8 EDTA prosedürü seçildi.

Kesitler otomatik cihazda zemin boyaması için asitsiz Haris Hematoksilen aşamasını da geçirdikten sonra cihazdan çıkarıldı. Sonra sırasıyla %70'lik alkolde 2 dakika, %80'lik alkolde 2 dakika, %95'lik alkolde 2 dakika tutuldu. Havada kurutulduktan sonra ksilolde 15 dakika tutulan kesitler entellan ile kapatıldı.

Pozitif kontrol lamları olarak: Prof. Dr. Gerard Nuovo'dan rica edildi ve gönderilen plasenta dokusunda boyanan sitotrofoblastik hücreler pozitif kabul edildi. İç negatif kontroller doku kesitlerinde var olan infiltratif lenfositleri kapsıyordu.

RT-PCR

Parafin bloklardan Pinpoint™ Slide RNA Isolation System II (Zymo Research Corp., U.S.A) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda RNA izolasyonu

yapıldı. Daha sonra Prime Script™ one step RT-PCR kit Ver.2 (TaKaRa Bio Inc,) ile cDNA elde edildi.

PCR

Reaksiyon mixi cDNA'dan 15 µl eklenerek toplam 100 µl olacak şekilde hazırlandı. Mix içeriği 10 mmol/L Tris-HCL, 50 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, primer OL252 ve OL68 (0.1nmol her birinden) ve 2.5 U Taq polimeraz ile hazırlandı. PCR döngüsü şu şekilde yapıldı: 94 °C'de 1.5 dakika denatürasyonu takiben 55 °C'de 1.5 dakika primer bağlanması yapıldı. Uzama 72 °C'de 3 dakika 30 siklus olacak şekilde ayarlandı. Ek uzama 72 °C'de 2 dakika olarak yapıldı.

Nested PCR

Birinci PCR ürününden 5 µl alınarak toplam volüm 100 µl olacak şekilde mix hazırlandı. Bu kez primer olarak OL24 ve OL 253 (her birinden 0.1 nmole) mixe eklendi. PCR döngüsü aynı şekilde yapıldı. PCR döngülerinde thermocyclers olarak MY Cyclers (Bio Rad) kullanıldı.

Sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Bunun için %1.5 agaroz jel kullanıldı. Elektroforez sonrası jeldeki bantlar Imaging System EL LOGIC 2200 (Kodak) görüntüleme sistemi ile incelendi. Kullanılan Primerler Alpha DNA (Montreal, Quebec H4C3N9) tarafından sentez edildi (Tablo:1).

Tablo 1: Cox V nested PCR'da kullanılan primerler¹⁹

Primerler	Pozisyon sırası	Amplikon uzunluğu
OL252 (forward)	GGCCCCTGAATGCGGCTAA	745bp
OL68 (reverse)	GGGACCTTCCACCACCANCC	
OL24 (forward)	CTACTTTGGGTGTCCG	215 bp
OL253 (reverse)	GATAC(T/C)TGAGCNCCCAT	

Coxsackie virus IgM ve IgG ELİSA alışması

Hastalardan alınan serum örnekleri çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı. Çalışma ncesi hasta serumları ve ELISA kiti oda ısısına getirildi. Çalışmaya alınan serumlarda Human Coxsackie Virus IgM ve IgG antikorları Cox V- IgM ve Cox V-IgG ELISA kiti (Cusabio Biotech Co., Ltd) ile üretici firmanın nerileri doğrultusunda çalışıldı. Sonuçlar ELİSA okuma cihazında 450 nm'de okundu. OD sample/ OD negative oranı ≥ 2.1 ise sonuç positive; < 2.1 ise sonuç negative olarak değerlendirildi. Her rnek iki kez çalışıldı.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizde χ^2 (ki kare), student-t, Fischer'in kesin ki kare testi, Mann Whitney U testleri kullanıldı. İstatistiksel hesaplamalar SPSS (Sürüm 13.0) kullanılarak yapıldı. İstatistiki hata payı 0.05 kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya toplam 32 Pemfigus hastası (18 kadın, 14 erkek) ve 40 kontrol olgusu (24 kadın, 16 erkek) dahil edildi. Bu hastaların 29'u PV, 3'ü PF tanılı idi. Yaş ortalaması hastalarda $56,0 \pm 13,7$ (35-86), kontrollerde $57,0 \pm 14,0$ olarak bulundu.

Yirmi bir hastaya ait perilezyonel deri örneğinin histopatolojik incelemesi Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştı. Bu 21 hastanın 13 'ü çalışma başladıktan sonra başvuran hasta idi. Geri kalan 8 hastanın parafin blokları arşivden çıkartılarak incelendi, bu hastalardan kan örneği alınmadı. On bir hastaya ait perilezyonel deri örneğinin histopatolojik incelemesi dış merkezde yapılmıştı, bu hastalardan sadece kan örneği alındı. Sonuç olarak 13 hastanın hem kan hem deri örnekleri, 8 hastanın sadece deri örnekleri ve 11 hastanın da sadece kan örnekleri incelendi.

Pemfiguslu hastaların perilezyonel deri örneklerinde CAR ekspresyonu ve Cox V-RNA'sı saptanmadı. Tüm hastalarda ve kontrollerde Cox V-IgM antikoruna negatif. Dört hastada (%12,5) ve iki kontrolde (%5) Cox V-IgG antikoruna pozitif olarak bulundu ($p > 0,05$). Serolojik inceleme yapılan hastaların yaş ortalaması ($55,8 \pm 13,1$; min.35-max. 86) ve cinsiyet açısından (13 kadın, 11 erkek) kontrollerle benzerlik göstermekteydi ($p > 0,05$).

TARTIŞMA/SONUÇ

Viral enfeksiyonlar tip 1 diyabet, romatoid artrit, lupus eritematozus, multipl skleroz, Sjögren sendromu ve Hashimoto tiroiditi gibi birçok otoimmün hastalıkta tetikleyici faktör olarak suçlanmıştır. Pemfigus etiyopatogenezinde de farklı virüsler araştırılmıştır. Bunlar arasında HSV, VZV, EBV, CMV, HHV 8 ve HIV yer almaktadır.^{2,6-12}

Enfeksiyonlarla pemfigus arasındaki ilişki farklı şekillerde açıklanabilir:

İnfeksiyöz ajanlar genetik olarak yatkın bireylerde IFN ve IL üretimini upregüle eden bir immün yanıtı uyarabilir. Artmış IFN- γ keratinosit hücre zarları üzerindeki HLA tip 2 ekspresyonunu indükler ve pemfigus antijeninin yapısal alanını immunolojik olarak aktive eder. Ek olarak, kronik viral enfeksiyon IL-4 ve IL-10 aşırı üretimine yol açarak immün yanıtın Th1'den Th2'ye kaymasına ve antikor yanıtını potansiyalize etmeye neden olur.

Viral enfeksiyonlar T ve B lenfositleri direkt enfekte edebilir, böylece otoreaktif B lenfositlerin ve otoimmün antikorların üretimine katkıda bulunabilir.

Virüs ile enfekte olmuş keratinositlerle yakınındaki etkilenmemiş hücrelerin zar proteinlerinde yapısal değişikliklere yol açarak yeni immunojenik antijenlerin oluşumuna neden olabilir.¹⁸

Cox V'ler histopatolojik olarak akantolize yol açan, herpangina ve el-ayak-ağız hastalığı etiyopatogenezinde yer alan enterik virüslere aittir.^{1,13} Cox V'lerin pemfigus patogenezinde arttığı gösterilmiş olan uPA aktivitesini ve IL-1 α , TNF- α ve IFN- γ gibi çeşitli sitokinlerin düzeylerini arttırdığının çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş olması Cox V'lerin pemfigus patogenezinde yer aldığı şüphesini doğrulamaktadır.^{3,4,13,17-19} Ruocco ve ark. tarafından bildirilen herpangina enfeksiyonu ve beraberinde

sefalosporin kullanımından iki hafta sonra ortaya çıkan pemfigus olgusu da bu şüpheyi destekler niteliktedir.²²

Bu çalışmada pemfiguslu hastaların perilezyonel deri örneklerinde gerek immunhistokimyasal inceleme gerekse RT-PCR yöntemi ile Cox V varlığına rastlanmadı. Cox V-IgG seroprevalansı istatistiksel anlamlı düzeyde olmasa da pemfiguslu hastalarda kontrollerden daha yüksek olarak saptandı. Bu sonuçlar viral genomun, myokarditlerde gösterildiği üzere, deride persistan hal alarak etki etmediğine işaret etmektedir. Bununla birlikte Cox V'lerin farklı mekanizmalar ile pemfigus patogenezinde yer alıp almadığının araştırılması ileri araştırmaların konusu olabilir.

KAYNAKLAR

1. James WD, Berger TG, Elston DM. *Andrew's Diseases of the Skin*, ed: Saunders Elsevier, Canada, (2006). Pp: 367-420.
2. Sagi L, Sherer Y, Trau H, Shoenfeld Y, Pemphigus and infectious agents, *Autoimmun Rev*, 8, 33-5, (2008).
3. Martel P, Joly P. Pemphigus: Autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. *Clin Dermatol*, 19, 662-74, (2001).
4. Feliciani C, Toto P, Wang B, Sauder DN, Amerio P, Tulli A. Urokinase plasminogen activator mRNA is induced by IL-1 and TNF- α in in vitro acantholysis. *Exp Dermatol*, 12, 466-71, (2003).
5. Rapini RP, Clinical and Pathologic Differential Diagnosis, ed: Dermatology, Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, Vol:1, Elsevier, Spain, (2008). Pp:1-22.
6. Yonus J, Ahmed AR. The relationship of pemphigus to neoplasia. *J Am Acad Dermatol*, 23, 498-502, (1990).
7. Memar OM, Rady PL, Goldblum RM, Yen A, Tying SK. Human herpesvirus 8 DNA sequences in blistering skin from patients with pemphigus. *Arch Dermatol*, 133; 1247-1251, (1997).
8. Jang HS, Oh CK, Lim JYo, Jun ES, Kim YS, Kwon KS. Detection of human herpesvirus 8 DNA in pemphigus and chronic blistering skin diseases. *J Korean Med Sci*, 15, 442-8, (2000).
9. Wang GQ, Xu H, Wang YK, Gao XH, Zhao Y, He C, Inoue N, Chen HD. Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J Am Acad Dermatol*, 52, 460-7, (2005).

10. Kalra A, Ratho RK, Kaur I, Kumar B. Role of herpes simplex and cytomegalo viruses in recalcitrant oral lesions of pemphigus vulgaris. *Int J Dermatol*, 44, 259-260, (2005).
11. Horiguchi Y, Fujii S, Takase S, Mori R. Case of pemphigus vulgaris in oral mucosa showing an extension to the body surface with recurrent varicella. *Int J Dermatol*, 44, 951-954, (2005).
12. Goon ATJ, Tay YK, Tan SH. Pemphigus vulgaris following varicella infection. *Clin Exp Dermatol*, 26, 661-663, (2001).
13. Nair S, Leung KC, Rawlinson WD, Naing Z, Craig ME. Enterovirus Infection Induces Cytokine and Chemokine Expression in Insulin-Producing Cells. *J Med Virol*, 82, 1950-7, (2010).
14. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*, 10, 778-90, (2010).
15. Spotnitz MD, Lesch M. Idiopathic Dilated Cardiomyopathy as a Late Complication of Healed Viral (Coxsackie B virus) Myocarditis: Historical Analysis, Review of the Literature and a Postulated Unifying Hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis*, 49, 42-57, (2006).
16. Yajima T, Knowlton KU. Viral Myocarditis: From the Perspective of the Virus. *Circulation*, 119, 2615-24, (2009).
17. Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, Vanhoutte D, Gao F, Torpai R, Baker AH, Padalko E, Neyts J, Schultheiss HP, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM. Inhibition of Urokinase-Type Plasminogen Activator or Matrix Metalloproteinases

- Prevents Cardiac Injury and Dysfunction During Viral Myocarditis. *Circulation*, 114, 565-73, (2006).
18. Glück B, Schmidtke M, Merkle I, Stelzner A, Gemsa D. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice *J Mol Cell Cardiol*, 33, 1615-26, (2001).
 19. Vreugdenhil GR, Wijnands PG, Netea MG, van der Meer JW, Melchers WJ, Galama JM. Enterovirus-induced production of pro-inflammatory and T-helper cytokines by human leukocytes. *Cytokine*; 12; 1793-6, (2000).
 20. Feliciani C, Toto P, Amerio P, Pour SM, Coscione G, Amerio P, Shivji G, Wang B, Sauder DN. In vitro and in vivo expression of interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α mRNA in pemphigus vulgaris: Interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α are involved in acantholysis. *J Invest Dermatol*; 114; 71-7, (2000).
 21. Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, Stanley JR. Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Bio*, 16, 536-543, (2004).
 22. Ruocco E, Lo Schiavo A, Baroni A, Sangiuliano S, Puca RV, Brunetti G, Ruocco V. Pemphigus vulgaris after coxsackievirus infection and cephalosporin treatment: a paraviral eruption? *Dermatology*, 216, 317-319, (2008).
 23. Zillikens D. Autoimmune Bullous Diseases., ed: Braun Falco's Dermatology, Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, Springer, Italy, (2009). Pp: 641-668.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 2009BSP 016
Proje Başlığı: Pemfigus Etiyopatogenezinde Coxsackie Virüsün Olası Rolünün Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. Nida Kaçar, Doç. Dr. Nural Cevahir, Prof. Dr. Neşe Çallı Demirkan, Doç. Dr. Berna Şanlı Erdoğan
Projenin Yürütüldüğü Birim: Dermatoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim dalı
Varsa, Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Rektörlük Binası, Kınıklı Kampüsü, 20070 Denizli
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 21.07.2009-26.04.2011
Özet (en çok 70 kelime): Pemfigus etiyopatogenezinde virüslerin de suçlandığı otoimmün büllöz hastalıklar grubudur. Bu çalışmada pemfigus patogenezinde yer alan çeşitli sitokinler üzerine etkileri olan Coxsackie virüsler araştırılmıştır. Hastaların perilezyonel deri örneklerinde Cox V-RNA ve Coxsackie Adenovirüs reseptör ekspresyonu saptanmamıştır. Cox V-IgG seroprevalansı anlamlı düzeyde olmasa da Pemfiguslu hastalarda kontrollerden yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar viral genomun, deride kalarak etki etmediğine işaret etmektedir. Bununla birlikte Cox V'lerin farklı mekanizmalarla pemfigus patogenezinde yer almadığının araştırılması gereklidir.
Anahtar Kelimeler: pemfigus, enfeksiyon, virüs, Coxsackie virüs, akantoliz, akantolitik hastalık, enterovirüs
Varsa, Projeden Yapılan Yayınlar: