Archive of SID

دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پنجم، شماره ۲، صفحه ۱۳۳-۱۲۹ (اسفند ۱۳۸۱)

نقش عوامل هومورال سیستم ایمنی در پاتوژنز بیماری ویتیلیگو*

محمد حجت فرسنگی **[۱]،دکتر شکراله فرخی[۲] ،دکتر محمد کاظم نوح پیشه [۳]، رحیم طهماسبی[۳]

[۱]کارشناس ارشد ایمونولوژی ،دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[۲] پزشک عمومی ،معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[۳] استادیار بیماریهای پوست، دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[۴] کارشناس ارشد آمار حیاتی ،دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

چکیده:

بیماری ویتیلیگو یا پیسی نوعی بیماری پوستی است که همراه با فقدان و یا تخریب ملانوسیت های پوست است. تا کنون نقش فاکتور های هومورال سیستم ایمنی شامل وجود آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها ،فاکتور روماتوئیدی (IgM-RF) ،مقدار فاکتورهای C_3 و C_4 و آنتی بادی های ضد آنتی ژن های هسته ای (ANA) در این بیماری مورد بررسی قرار گرفته اند. در این مطالعه، سرم ۵۵ بیمار مبتلا به ویتیلیگو و ۶۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفت. اندازه گیری آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها و آنتی ژن های هسته ای با روش ایمونو فلورسنت غیر مستقیم ، اندازه گیری C_3 و C_4با روش SRID و تشخیص و اندازه گیری فاکتور روماتوئیدی با روش لاتکس و الیزا انجام شد. تست ANA در ٤ بیمار (۷/۳٪) و یک فرد سالم مثبت بود ($P>0/05$). در ١٤ بیمار (۲۵/۵٪) مقادیر C_3 و C_4 کاهش یافته بود؛ در افراد سالم مقادیر این اجزاء طبیعی بود ($P<0/05$) . در اندازه گیری فاکتور روماتوئید با روش الیزا، ٦ بیمار (۱۰/۸٪) دارای نتیجه مثبت بودند، در حالیکه همه افراد گروه کنترل دارای نتیجه منفی بودند ($P<0/05$) و با روش لاتکس در همه افراد گروه بیمار و کنترل نتیجه تست منفی بود. ۱۷ نفر از بیماران (۳۰/۹٪) دارای آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها بودند در حالی که در همه افراد گروه کنترل نتیجه منفی بود($P<0/001$). بنابراین سیستم ایمنی در بیماری ویتیلیگو نقش مهمی داشته و بنظر می رسد این بیماری یک بیماری خود ایمن بوده و لازم است که با انجام مطالعات بیشتر در این زمینه و بررسی نقش دیگر فاکتور های مهم سیستم ایمنی ، اهمیت نقش این سیستم در پاتوژنز این بیماری بعنوان یک بیماری خود ایمن روشن تر گردد.

واژگان کلیدی : ویتیلیگو ؛ ANA، آنتی بادی های ضد ملانوسیت ، فاکتور روماتوئیدی، کمپلمان

---

*این پروژه با بودجه و امکانات مرکز پژوهشهای سلامت خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی بوشهر انجام گردیده است.
** آدرس : بوشهر ، خیابان معلم ، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر – مدیریت پژوهشی – صندوق پستی : ۳۶۳۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری ویتیلیگو یا پیسی نوعی بیماری پوستی است که در آن سلول های ملانوسیت در نقاط مختلف بدن بخصوص پوست و سایر نقاط مثل مجرای گوش داخلی ،پرده های مغز ،شبکیه ،مشیمیه ومعده تخریب می شوند (۱). از آنجایی که در این بیماری عمدتاً نقاطی از بدن مثل پوست صورت و دست ها که بیشتر در معرض نور آفتاب هستند درگیر می شوند ،افراد مبتلا بواسطه تأثیر آن در زیبایی ظاهری ،عمدتا دچار بیماری های روحی روانی می شوند(۲). در حال حاضر هنوز درمان قاطعی برای بیماری ،بخاطر مشخص نبودن علت اصلی وجود ندارد و بطور کلی سه فرضیه مهم در مورد علت بیماری مطرح می باشد که شامل نقش عوامل عصبی ،خود تخریبی ملانوسیت ها و نقش سیستم ایمنی می باشند(۴-۳).

با توجه به اینکه در بیماران مبتلا تظاهرات بیماری متفاوت می باشد ،بنظر می رسد که اتیولوژی آن هم در افراد مختلف فرق دارد ،ولی در مجموع شواهد زیادی دال بر نقش سیستم ایمنی برای ایجاد این بیماری وجود دارد. در مطالعات مختلفی که در این زمینه صورت گرفته است از بین عوامل ایمونولوژیک، وجود آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها که باعث تخریب این سلول ها در پوست می شوند از مهمترین عوامل ایجاد بیماری مطرح می باشد(۵).

در مطالعاتی که در زمینه اتیولوژی بیماری صورت گرفته است ،نقش عوامل ژنتیکی در بروز بیماری به اثبات رسیده است ،بطوریکه در مطالعه انجام شده در کشور عمان ۸۲ درصد بیماران مبتلا دارای $HLA\text{-}Dw_6$ و ۴۰ درصد دارای HLA-DR7 بودند، در مقایسه با ۹ درصد افراد گروه کنترل که دارای $HLA\text{-}DR_7$ بودند(۶). در مطالعه دیگری که در کویت روی ۴۰ بیمار انجام شد ،بیان ملکول های $HLA\text{-}B_{21},Cw_6,DR_{53}$ در مقایسه با گروه کنترل افزایش قابل توجهی را نشان داد(۷). از عوامل مطرح دیگر که نشاندهنده نقش عوامل ایمونولوژیک در اتیولوژی این بیماری می باشد ،افزایش میزان اتو آنتی بادی های طبیعی و همینطور بالا رفتن تیتر فاکتور های رومانوئیدی می باشد(۸).

از آنجایی که شناخت علت دقیق بیماری مهمترین امر در درمان بوده و با توجه به اینکه شواهد زیادی نشاندهنده نقش عوامل ایمونولوژیک در ایجاد این بیماری می باشد ،در این تحقیق تغییرات فاکتورهای مختلف سیستم ایمنی هومورال شامل تولید اتو آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها و آنتی ژن های هسته ای ،کاهش مقادیر سرمی فاکتور های کمپلمان شامل C_4,C_3 و افزایش مقدار فاکتور رومانوئیدی از نوع IgM-RF مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

این مطالعه مورد – شاهدی بروی ۵۵ بیمار مبتلا به ویتیلیگو (از نوع Non-segmental) که از تاریخ فروردین الی اسفند ۱۳۸۰ به متخصص پوست در درمانگاه ابوالفضل بیمارستان فاطمه زهرای بوشهر مراجعه کرده بودند و ۶۰ فرد سالم بعنوان کنترل انجام شد. بیماران توسط متخصص پوست معاینه شده و پس از مشاهده علائم بیماری از افراد نمونه خون گرفته شد و پس از جداسازی سرم آن ،نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایش ها نگهداری شدند.

الف: تست تشخیص آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها:

برای تشخیص آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها از روش ایمونوفلورسنت غیر مستقیم بر روی رده سلولی SK-MEL-3 (رده سرطان ملانومای انسان- انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. برای انجام تست پس از کشت سلول های SK-MEL-3 و تکثیر انها در محیط کشت RPMI-1640 ،سه مرتبه شستشوی این سلول ها با سرم فیزیولوژی انجام و در نهایت سلول ها برای انجام تست بروی اسلاید فیکس شدند. در اولین مرحله تست سرم افراد با رقت ۱:۱۰ بروی سلول های متصل به کف اسلاید اضافه و پس از یک ساعت اینکوبه در محیط ازمایشگاه اسلاید ها سه مرتبه با بافر PBS شستشو شدند. در مرحله بعد به این سلول ها آنتی ایمونوگلوبولین نشاندار با ماده فلورسنت FITC (ساخت شرکت DAKO) با رقت ۱:۲۰۰ اضافه شد. پس از یک ساعت اینکوبه و سه مرتبه شستشوی اسلاید ها ،نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی شدند. برای نمونه های مثبت ،پس از تهیه رقت های ۱:۲۰ ،۱:٤۰ ،۱:۸۰ ،۱:۱٦۰ ،۱:۳۲۰ ،۱:٦٤۰و ۱:۱۲۸۰ از سرم ،تست مجددا برای هر رقت تکرار گردید و آخرین تیتر مثبت گزارش گردید.

ب:تست تشخیص آنتی بادی های ضد آنتی ژن های هسته ای(*ANA*):

برای انجام این تست از روش ایمونوفلورسنت غیر مستقیم و رده سلولی Hela استفاده شد. قبل از انجام تست سلول ها مثل روش قبل تکثیر شده و بروی اسلاید فیکس شدند. در اولین مرحله سرم افراد با رقت ۱:۲۰ به روی سلول ها اضافه شده و پس از ٤۵ دقیقه اینکوبه سه مرتبه شستشوی اسلاید ها با بافر PBS انجام گرفت. در مرحله بعد به این سلول ها آنتی ایمونوگلوبولین نشاندار با FITC با رقت ۱:۲۰۰ اضافه و مثل مرحله قبل اینکوباسیون و شستشو انجام و در نهایت سلول ها با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. برای نمونه های مثبت رقت های ۱:٤۰، ۱:۸۰، ۱:۱٦۰، ۱:۳۲۰، ۱:٦٤۰، ۱:۱۲۸۰ تهیه و مجددا تست برای هر رقت تکرار گردید و آخرین تیتر مثبت گزارش گردید.

ج:تست های تشخیص فاکتور روماتوئیدی(*IgM-RF*):

برای انجام این تست از کیت الیزای ساخت شرکت DRG آلمان استفاده شد. روش انجام تست به این صورت بود که در مرحله اول ۱۰۰ میکرولیتر سرم بیماران با رقت ۱:۲۵ به حفرات پلیت الیزا اضافه و پس از ۳۰ دقیقه اینکوبه سه مرتبه عمل شستشو انجام شد. سپس به همه حفرات پلیت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آنتی ایمونوگلوبولین نشاندار با آنزیم اضافه و پس از ۳۰ دقیقه اینکوبه مجددا سه مرتبه شستشو انجام شد. در آخرین مرحله تست به همه حفرات ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا اضافه و پس از ۱۵ دقیقه اینکوبه ،به همه حفرات ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ،جهت توقف واکنش اضافه و جذب نوری حفرات در ٤۹۰ نانومتر اندازه گیری شد.

در روش لاتکس برای تشخیص فاکتور روماتوئیدی در سرم بیماران ،ابتدا یک قطره سرم بروی یک اسلاید با زمینه مشکی اضافه و به آن یک قطره محلول حاوی IgG متصل به ذرات لاتکس اضافه شد. پس از ۳ دقیقه هم زدن محلول با دستگاه Shaker ،نتیجه آگلوتیناسیون بصورت مثبت و منفی گزارش شد.

د:اندازه گیری مقادیر C_4, C_3:

برای اندازه گیری هر یک از این فاکتورها از روش SRID استفاده گردید. در این روش به حفرات پلیت مخصوص C_4, C_3 مقدار ۵ میکرولیتر سرم بیماران و کنترل بارقت ۲:۱ (نمونه ها با سرم فیزیولوژی رقیق شدند) اضافه شد. پس از ٤۸ ساعت اینکوبه ، قطر دایره های رسوبی ایجاد شده با خط کش مخصوص اندازه گیری شده و نهایتاً با استفاده از نمودار استاندارد، مقدار C_4,C_3 هریک از نمونه ها بدست آمد.

نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون های آماری مربع کای و T test و توسط نرم افزار آماری (SPSS V.10) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

الف: نتایج آزمایش تشخیص آنتی ملانوسیت آنتی بادی ها:

نتایج حاصل از وجود آنتی بادیهای ضد ملانوسیت ها نشان داد که از ۵۵ بیمار مورد بررسی ۱۷ نفر (۳۰/۹٪) دارای نتیجه مثبت بودند و از لحاظ آماری ارتباط معنی داری بین بیماری ویتیلیگو و وجود آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها بدست آمد (P<۰/۰۰۱) . تمام افراد گروه شاهد فاقد آنتی بادی های ضد ملانوسیت بودند.

ب: نتایج حاصل از تست *ANA*:

از بین ۵۵ بیمار مبتلا تنها ٤ نفر (۳/۷٪) و از بین ٦۰ نفر گروه کنترل نیز یک نفر (۱/۷٪) دارای تست مثبت ANA بود. اختلاف معنی داری بین بیماری و وجود ANA در بیماران مشاهده نشد.

ج : نتایج تست تشخیص فاکتور روماتوئیدی *(IgM-RF)*:

با روش الیزا ٦ نفر از بیماران (۱۰/۸٪) دارای نتیجه مثبت و همه افراد گروه کنترل دارای نتیجه منفی بودند (P= ۰/۰۰۵).
در ضمن با روش لاتکس کلیه افراد بیمار و گروه کنترل دارای نتیجه منفی بودند.

د: نتایج آزمایش *C4 C3*:

www.SID.ir

Archive of SID

از بین ۵۵ فرد بیمار ٤ نفر دارای مقادیر کاهش یافته C_3 بودند و تنها یک نفر از گروه کنترل دارای مقادیر C_3 پایین تر از حد نرمال بودند و کاهش میزان C_3 ارتباط معنی داری را با بیماری نشان داد ($P< ۰/۰۵$). همینطور در مورد مقادیر C_4 تعداد ١٤ نفر (۲۵/۵ ٪) از بیماران دارای مقادیر زیر نرمال بودند ($P< ۰/۰۰۱$ جدول ۱).

جدول ۱) مقایسه فاکتورهای ایمنولوژیک بیماران مبتلا به ویتیلیگو با افراد شاهد

	مورد		شاهد	
	مثبت	منفی	مثبت	منفی
ANA	٤	۵۱	۱	۵۹
کاهش C3	٤	۵۱	۱	۵۹
کاهش C4	١٤	٤١	۰	٦۰
آنتی بادی ضد ملانوسیت	۱۷	۳۸	۰	٦۰
روماتوئید فاکتور (ELISA)	٦	٤۹	۰	٦۰
روماتوئید فاکتور(Latex)	۰	۵۵	۰	٦۰

بحث

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان دهنده ارتباط فاکتورهای هومورال سیستم ایمنی با بیماری ویتیلیگو می باشد که از این بین آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها دارای مهمترین نقش در پاتوژنز بیماری می باشند. نتایج به دست آمده از مطالعه گیل هار (Gilhar) و همکاران در تایید این نظریه می باشد که در سال ۱۹۹۵ با استفاده از سه روش رنگ آمیزی دی هیدروکسی فنیل آلانین ، ایمونوفلورسنت مستقیم و میکروسکوپ الکترونی وجود آنتی بادی های کلاس IgG بر علیه ملانوسیت ها را نشان دادند(۹).

در مطالعه پارک (Park) و همکاران با استفاده از روش ایمونوفلورسنت غیر مستقیم بر روی سرم ۱۸ بیمار ویتیلیگو نشان دادند که آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها عمدتاً بر علیه یک آنتی ژن ٦۵ کیلو دالتونی که عمدتاً در ملانوسیت ها وجود دارد، تولید می شود که این نتایج در تأیید مطالعه حاضر می باشد(۱۰).

در مطالعه ایکسه (Xie) و همکاران که در سال ۱۹۹۵ بر روی ۵۳ بیمار مبتلا به ویتیلیگو انجام گرفت، در ۹ بیمار وجود آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها ، بخصوص بر علیه تیروزیناز را در سرم این بیماران نشان دادند که این مطالعه نیز نشان دهنده نقش مهم این آنتی بادی ها در تخریب ملانوسیت ها می باشد (۱۱). در مطالعه کمپ Kemp و همکاران در سال ۱۹۹۹ بر روی ۵۳ بیمار با روش رادیوایمونواسی مشخص شد که در سرم اکثر این بیماران آنتی بادی های ضد پروتئین تیروزیناز انسانی ۱ (TRP-1) وجود دارد و ۱۰ بیمار از بین ۵۳ بیمار فوق مبتلا به بیماری تیروئیدیت هاشیموتو و ۱۰ بیمار دیگر نیز مبتلا به بیماری گریوز بودند که این امر همراهی دیگر بیماری های خود ایمن و نقش عوامل ایمونولوژیک را در ابتلاء به ویتیلیگو تأیید می کند(۱۲).

همینطور در مطالعه لی(Li) و همکاران در سال ۲۰۰۱ مشخص شد که در سرم بیماران ویتیلیگو آنتی بادی های ضدملانوسیت ها از کلاس IgG وجود دارد و نشان دادند که این آنتی بادی ها در In vitro با کمک کمپلمان و مکانیسم ADCC سلول های ملانوسیت را تخریب می کنند و این مطالعه نیز در تأیید مطالعه ما و نقش مهم آنتی بادی های ضد ملانوسیت ها در ایجاد بیماری ویتیلیگو می باشد(۱۳). در مطالعه انجام شده توسط خانم واحدی و همکاران در سال ۱۳۷۷ که بر روی ۳۲ بیمار مبتلا به ویتیلیگو انجام شد، مشخص شد که بین فاکتور روماتوئیدی (IgA-RF) و بیماری ویتیلیگو ارتباط معنی داری وجود دارد و برای توجیه نقش این فاکتور در پاتوژنز بیماری تغییرات این فاکتور را در بیماران و ارتباط آن را با سایر ملکول های سطحی ملانوسیت ها مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد که با افزایش طول دوره بیماری ، تیتر فاکتور روماتوئیدی -IgA) (RF در سرم ۷ بیمار (۲۱٪) افزایش یافته که احتمالاً دلیل آن سوئیچ شدن IgM-RF به سمت IgA-RF با طولانی شدن بیماری می باشد ؛ در سرم ١٦ بیمار مبتلا فاکتور روماتوئیدی از نوع IgM-RF وجود داشت (١٤). نتایج به دست آمده از

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه فوق در تأیید مطالعه ما می باشد که مشخص شد بین حضور فاکتور روماتوئیدی (IgM-RF) و بیماری ویتیلیگو ارتباط معنی داری وجود دارد. در مطالعه ما مشخص گردید شد که بیشترین اتوآنتی بادی موجود در سرم بیماران مبتلا به ویتیلیگو از نوع آنتی ملانوسیت آنتی بادی ها می باشند و تنها ۳۰/۹٪ بیماران دارای آن بودند. عدم وجود آنتی ملانوسیت آنتی بادی ها در سایر بیماران مبتلا احتمالا به دلایل مختلفی مثل مرحله بیماری (فعال بودن یا غیر فعال بودن بیماری)، مصرف داروهای سایرس کننده سیستم ایمنی، حساسیت تست، وجود آنتی بادی های غیر از کلاس IgG و غیره می باشد.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و بسیاری از مطالعات دیگر نشان دهنده نقش بسیار مهم سیستم ایمنی در پاتوژنز بیماری می باشد و برای اثبات قطعی این امر انجام مطالعات بیشتر لازم به نظر می رسد و با توجه به این نتایج به نظر می رسد که مصرف داروهای سایرس کننده سیستم ایمنی جهت درمان این بیماری می تواند نقش بسیار مهمی را در بهبودی بیماران داشته باشد.

REFERENCES :

1. Notsnud G. Vitiligo is associated with HLA-DR in black patient. J Dermatol 1990; 126: 56-60.
2. Cruz M. Myasthenia gravis and vitiligo. Muscle Nerve 1994; 17: 556-60.
3. Lerner A. Vitiligo. J Invest Dermatol 1959; 32: 285-91.
4. Takashima D. Try-1+ dendritic epidermal cell in mice. J Invest Dermatol 1988; 90: 671-78.
5.Freeberg I. Keratinocytes. American Academy of Dermatology.
http://www.aad.org/education/Keratinocytes.htm
(Updated: 11 September 2003).
6. Venkataram M. HLA antigens in omani patients with vitiligo. Clin Exp Dermatol 1995; 20: 35-7.
7. Alfouzan A. Study of HLA classl/II and T lymphocyte subsets in kuwaiti vitiligo patients. Eur J Immunogenet 1995; 22: 209-13.
8.Padula A , Ciancio G, La Civita L,et al. Association between vitiligo and spondyloarthritis. J Rheumatol 2001;28 :313-4.
9. Gilhar A, Zelickson B, Ulman Y, et al. In vivo destruction of metanocytes by the lgG fraction of serum from patients with vitiligo. Invest Dermatol 1995;105: 683-6.
10. Louis ST. Light related diseases and disorders of pigmentation. In:Klein AE, Menczer BS. Habif's clinical dermatology 4th ed. Philadelphia: Mosby,1999, 488-93.
11. Xie Z. Vitiligo antibodies are not directed to tyrosinase. Arch Dermatol 1999; 1325: 417-22.
12. Kemp E, Waterman E, Gawkrodger D, et al. Autoantibodies to tyrosinase – related – 1 detected in the sera of vitiligo.. Br J Dermatol 1998; 139: 798-805.
13. Li Y. IgG. Anti-melanocyte antibodies purified from patients with active vitiligo. J Invest Dermatol 2000; 115: 969-73.
۱٤. واحدی م، بررسی نقش مکانیسم های ایمونولوژیک در بیماری ویتیلیگو ، پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونو لوژی ، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۱۳۷۷.

www.SID.ir