Archive of SID

بررسی ایمونوفلورسانس مستقیم بر پوست جداشده با نمک در افتراق بیماری‌های تاولی ساب اپیدرمال اتوایمون

دکتر زهرا صفائی نراقی[1]، دکتر زهرا حلّاجی[2]، دکتر مریم دانش پژوه[2]، دکتر همایون مصلحی[2]، دکتر کامران جزایری[3]

۱- دانشیار آسیب‌شناسی، ۲- استادیار پوست، ۳-دستیار پوست؛ بیمارستان رازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه : پمفیگوئید تاولی (BP) سردسته بیماریهای تاولی ساب اپیدرمال اتوایمون است. روش ایمونوفلورسانس مستقیم با استفاده از سوبسترای پوست جدا شده با نمک (DIF on salt split skin, DIF – SS) یکی از روشهاییست که در افتراق این بیماریها که وجوه اشتراک بسیاری دارند، بکار می‌رود.

هدف : هدف از این مطالعه پی‌بردن به نتایج DIF-SS در بیماران تاولی ساب اپیدرمال اتوایمون بود.

بیماران و روشها : در طول یک سال از میان بیماران تاولی که به بیمارستان رازی ارجاع شده بودند، هفده بیمار که تظاهر بالینی آنها شبیه BP بود و در ایمونوفلورسانس مستقیم رسوب خطّی در غشای پایه داشتند، بررسی شدند. بر اساس یافته‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک، یک تشخیص نهایی برای هر یک از بیماران در نظر گرفته شد. آزمایش DIF-SS روی پوست کنار ضایعه بیماران انجام شد. نتایج هیستوپاتولوژی ، DIF–SS و تشخیص نهایی برای بیماران ثبت و مقایسه شدند.

یافته‌ها : نمای DIF – SS در یازده بیمار (۶۵٪) مختلط (اپیدرمال و درمال) ، در ۲ بیمار (۱۲٪) اپیدرمال و در ٤ بیمار (۲۳٪) درمال بود. تشخیص نهایی در ده بیمار BP و برای دو بیمار اپیدرمولیز تاولی اکتسابی (EBA) بود. در دو بیمار امکان افتراق بین BP و EBA میسر نشد. در ده بیماری که تشخیص نهایی BP داشتند، نه بیمار (۹۰٪) نمای مختلط و یک بیمار (۱۰٪) نمای اپیدرمال در DIF-SS نشان دادند.

نتیجه‌گیری : برخلاف نتایج مطالعات قبلی که در آنها در BP نمای اپیدرمال از نمای مختلط شایع‌تر گزارش شده، در این مطالعه نمای مختلط نه برابر از نمای اپیدرمال فراوان‌تر بود. شاید تفاوت آنتی‌ژن هدف در بیماران ما علّت اصلی این تفاوت باشد.

واژه‌های کلیدی: پمفیگوئید تاولی، پوست جداشده با نمک، ایمونوفلوسانس مستقیم

مقدمه

پمفیگوئید سردسته گروهی از بیماریهای پوستی است که مجموعاً بیماریهای تاولی اتوایمون ساب اپیدرمال (Subepidermal Autoimmune Bullous Dermatoses , SABD) نامیده می‌شوند. SABD شامل بیماریهائی چون پمفیگوئید تاولی (BP)، اپیدرمولیز تاولی اکتسابی (EBA)، Linear IgA Bullous Dermatosis(LABD)و Dermatitis Herpetiformis (DH) می‌باشد. وجه مشترک این بیماریها از نظر آسیب‌شناسی، جداشدن درم و اپیدرم در ناحیه Basement Membrane Zone (BMZ) و از نظر

مولف مسئول : دکتر کامران جزایری – تهران ، خیابان وحدت اسلامی، میدان وحدت اسلامی، بیمارستان رازی

Archive of SID

ایمونوپاتولوژی رسوب ایمنی به صورت خطی یا گرانولر در BMZ است.

با وجود چهره بالینی متمایز برای هر بیماری، در برخی از موارد به علت وجود تشابهات بالینی، افتراق غیرممکن می‌گردد. در این موارد برای رسیدن به تشخیص قطعی باید از روش‌های کمکی چون آسیب‌شناسی و ایمونوفلورسانس کمک گرفت.

در سال ۱۹۸۳، Woodley و همکاران یک روش جدید ایمونوفلورسانس را ابداع کردند که طی آن پوست سالم برای ۴۸ تا ۷۲ ساعت در محلول یک مولار نمک طعام در دمای c ° ٤ قرار داده می‌شد و سپس با فشار مکانیکی، درم و اپیدرم از هم جدا می‌شدند (salt splitting). آنها نشان دادند که این شکاف از نظر فراساختمانی در ناحیه لامینا لوسیدا پدید می‌آید و آنتی‌ژن‌های BP بر روی سقف و کلاژن IV در کف شکاف قرار دارند. (۱)

Gammon و همکاران اولین کسانی بودند که با انجام آزمایش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از سرم بیماران پمفیگوئیدی روی پوست سالم جداشده با نمک (Indirect Immunofluoroscence on Salt Split skin, IIF-SS) دریافتند که زیر گروهی در حدود ۱۰٪ در میان این بیماران وجود دارد که تشخیص پاتوژنتیک اصلی آنها EBA می‌باشد. در این زیرگروه، در آزمایش IIF-SS رسوب ایمنی در کف شکاف جای گرفته بود(نمای درمال) و با روش ایمونوالکترون میکروسکوپی نشان دادند که این رسوب زیرلامینا دنسا جای دارد. در حالیکه در بقیه بیماران مورد مطالعه، رسوب در لامینالوسیدا قرار داشت و در IIF-SS آنها نیز رسوب ایمنی یا در سقف (نمای اپیدرمال) و یا هم در کف و هم در سقف شکاف (نمای مختلط) جای داشت (۲).

از آنجا که حساسیت روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در BP ۸۰-۷۰٪ و در EBA ۵۰٪ میباشد، Gammon و همکاران برای افزایش حساسیت تشخیص SABD، از پوست ضایعه (Lesional Skin) جدا شده با نمک به عنوان سوبسترا استفاده کردند و در واقع روش ایمونوفلورسانس مستقیم روی پوست سالم جدا شده با نمک (DIF-SS) را ابداع نمودند که حساسیت بیشتری دارد(۳).

هدف از انجام مطالعه بررسی روش DIF-SS در بیماریهای تاولی ساب اپیدرمال اتوایمون در بیماران ایرانی بود.

بیماران و روش‌ها

در طول سال ۱۳۷۸ همه بیماران تاولی که به بیمارستان رازی ارجاع شده بودند و تظاهر بالینی آنها شبیه BP بود، مورد بررسی قرار گرفتند. از پوست هر بیمار یک نمونه‌برداری انجام شد که شامل پوست ضایعه و اطراف ضایعه بود. نمونه اطراف ضایعه به دو نیمه تقسیم شد. یک نیمه فوراً منجمد شد و نیمه دیگر، برای ٤٨ تا ٧٢ ساعت در محلول نمک طعام یک مولار، در دمای c ° ٤ نگهداری شد. پس از سپری شدن این مدت، اپیدرم نمونه انکوبه شده با یک ابسلانگ روی درم لغزانده شد، تا درم و اپیدرم از هم جدا شوند. نیمه منجمد شده و نیمه جدا شده با نمک به طور جداگانه در ژل OCT life ، cytomatrix (Shandon Science International Ltd, Cheshire England) غوطه‌ور و در دمای c °۲۰ – منجمد شدند. سپس هر نمونه با استفاده از Cryocut به ضخامت ۲ تا ٤ میکرون برش داده شد و پنج لام از هر نیمه نمونه منجمد شده تهیه شد (مجموعاً ده لام برای هر بیمار). لام‌ها به طور همزمان با آنتی‌بادی‌های سرم خرگوش که با ایزوتیوسیانات فلورسئین (FITC) کونژوگه شده بودند،رنگ‌آمیزی شدند. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده ساخت شرکت DAKO(Lustrum, Denmark) شامل آنتی‌بادی‌های ذیل بودند:

1. Anti IgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda-FITC
2. Anti IgG-FITC
3. Anti IgM-FITC
4. Anti IgA-FITC
5. Anti C3c-FITC

پس از رنگ‌آمیزی و لامل گذاری، لام‌ها توسط یکی از مؤلفین (ک.ج) با میکروسکوپ Epifluoroscence بررسی شدند و نتایج DIF و DIF-SS برای هر بیمار ثبت گردید. به دلیل محدود بودن مقدار آنتی‌بادی‌های کنژوگه، در آزمایش ایمونوفلورسانس از کنترل مثبت و منفی استفاده نشد. بیمارانی که در DIF حداقل رسوب خطی یک آنتی‌بادی در ناحیهٔ غشای پایه داشتند، انتخاب شدند و بیماران با DIF منفی و یا بیمارانی که نماهایی غیر از نمای خطی (مانند نمای گرانولر و نمای بین سلولی) داشتند،از مطالعه کنار گذاشته شدند و بدین ترتیب در مجموع هفده بیمار به مطالعه راه یافتند.

از نمونه‌های پوست ضایعه بلوک‌های پارافینه تهیه و برش داده شد. پس از رنگ‌آمیزی H&E لام‌های تهیه شده توسط درماتوپاتولوژیست (ز.ص.ن) با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. آسیب‌شناس بدون آگاهی از نتایج DIF-SS یک تشخیص هیستوپاتولوژیک برای هر بیمار در نظر گرفت.

پرونده‌های هر یک از این هفده بیمار بررسی شد. تنها با در نظر گرفتن یافته‌های بالینی و آسیب‌شناسی یک تشخیص نهایی برای هر بیمار ثبت شد. در نهایت تشخیص‌های بالینی و هیستوپاتولوژیک با یافته‌های DIF-SS مقایسه و تطبیق داده شدند.

یافته‌ها

با انجام DIF-SS، در ۱۷ بیمار SABD مورد بررسی سه نمای متفاوت حاصل شد: یازده بیمار (۶۵٪) نمای مختلط (اپیدرمال و درمال)، پنج بیمار نمای اپیدرمال و ٤ بیمار (۲۳٪) نمای درمال را نشان دادند.

تشخیص نهایی در ده بیمار BP و در دو بیمار EBA بود. در دو بیمار امکان افتراق بین BP و EBA میسر واقع نشد. از میان سه بیمار باقیمانده یک مورد LABD، یک مورد Lichen Planus Pemphigoid و یک مورد اریتم مولتی فرم تشخیص داده شد (جدول شماره ۱).

در ده بیماری که تشخیص BP داشتند، در DIF-SS نه بیمار (۹۰٪) نمای مختلط و در یک بیمار (۱۰٪) نمای اپیدرمال دیده شد. در دو بیمار شماره ۹ و ۱۲ با وجود چهره بالینی شبیه BP، ولی به دلیل پیدایش تاولهای مکانیکی بعدی در سیر بیماری و نمای آسیب‌شناسی غیرالتهابی، تشخیص نهایی EBA داده شد. هر دو این بیماران در DIF-SS نمای درمال داشتند. در دو بیماردیگر (یعنی بیماران ۸ و ۱۰) افتراق EBA و BP میسر نگردید. بیمار شماره ۸ تظاهری شبیه BP لوکالیزه در اندام تحتانی و پاتولوژی مطابق BP و یا EBA داشت، در حالیکه بیمار شماره ۱۰، چهره بالینی شبیه BP ولی پاتولوژی غیرالتهابی داشت. در دو بیمار اخیر با وجود نمای درمال در DIF-SS به دلیل تناقض یافته‌های بالینی و آسیب‌شناسی افتراق BP از EBA ممکن نشد.

بحث

در جدول شماره ۲ نتایج مطالعات قبلی که با استفاده از روش ایمونوفلورسانس بر پوست جدا شده با نمک (IIF-SS) انجام شده‌اند، درج شده و این نتایج با نتایج مطالعه ما مقایسه شده‌اند. در مطالعاتی که روش غیرمستقیم(IIF-SS) بکار رفته، در بیماران پمفیگوئیدی فراوانی نمای اپیدرمال ۸ تا ۹ برابر فراوانی نمای مختلط می‌باشد (٦ و ٥ و٤) و در روش مستقیم (DIF-SS) نیز نمای اپیدرمال شایع‌تر بوده است ولی میزان اختلاف فراوانی دو نما کمتر است. (۸ و۷ و۳) این در حالی است

Archive of SID

Archive of SID

که در مطالعه ما، با استفاده از روش مستقیم (DIF-SS)، در ده بیماری که تشخیص نهایی آنها پمفیگوئید تاولی بود، فراوانی نمای مختلط ۹ برابر فراوانی نمای اپیدرمال بود. دلیل اختلاف نتایج ما با سایرین به خوبی روشن نیست. شاید به دلیل نداشتن کنترل و تعداد کم بیماران مورد مطالعه، این اختلاف صرفاً یک یافتهٔ تصادفی باشد. هر چند که در سه مورد از مطالعات قبلی که در جدول شماره ۲ نشان داده شده‌اند، تعداد بیماران تفاوت چندانی با تعداد نمونه‌های ما نداشته است(۸ و ۷ و ۳).

Labib و همکاران در سال ۱۹۸۶ نشان دادند ۵۰-۳۰ درصد سرم‌های بیماران پمفیگوئیدی حاوی آنتی‌بادی ضد BP Ag2 (180 kd) و ۷۰-۵۰٪ سرم‌های این بیماران حاوی آنتی‌بادی‌های ضد BP Ag 1 (230 kd) می‌باشند، و در یک زیر گروه از بیماران BP، آنتی‌بادی‌های سرمی با هر دو BP Ag واکنش نشان می‌دهند.(۹) Onadera و همکاران در مطالعه روی سرم بیماران پمفیگوئیدی، نشان دادند که تمام سرم‌های آنتی‌بادی ضد BP Ag 1 (۲۳۰ کیلو دالتون) در IIF-SS نمای اپیدرمال دارند ولی سرم‌های حاوی آنتی‌بادی ضد BP Ag 2 (۱۸۰ کیلو دالتون) و یا سرم‌هایی که با هر دو BP Ag واکنش نشان می‌دهند، در IIF-SS نمای اپیدرمال و یا نمای مختلط دارند(٤). Joly و همکاران نیز با استفاده از DIF-SS و ایمونوبلات در ۲۷ بیمار پمفیگوئیدی، دریافتند که در تمامی ۲۲ بیماری که BP Ag 1 در آنها آنتی‌ژن هدف بود، رسوب فقط در سمت اپیدرمال قرار گرفت، اما در ۵ مورد باقیمانده که BP Ag 2 آنتی‌ژن هدف بود، در سه مورد نمای مختلط و در دو مورد نمای اپیدرمال دیده شد (۷). بنابراین می‌توان چنین تصور کرد که شاید بدلیل تفاوت آنتی‌ژن هدف در بیماران BP ایرانی، نتایج متفاوتی بدست آمده باشد. یا به عبارت دیگر در نمونه‌های ما، تعداد بیمارانی که در آنها BP Ag 2 آنتی‌ژن هدف بوده بیش از بیمارانی است که آنتی‌ژن‌هدف آنها BP Ag 1 بوده است. برای اثبات این فرضیه باید از روش ایمونوبلات برای تعیین نوع آنتی‌ژن هدف در هر یک از بیماران استفاده کرد.

از طرفی امروزه در این مورد که BP Ag 2 آنتی‌ژن شروع‌کننده و اصلی در پاتوژنز پمفیگوئید است، اتفاق نظر وجود دارد. مطالعات انجام شده به روشنی نشان داده‌اند که در سیر پمفیگوئید، ابتدا آنتی‌بادیها برعلیه BP Ag 2 ساخته شده و متعاقباً به دلیل پدیده epitope spreading آنتی‌بادی بر علیه BP Ag 1 ساخته می‌شود (۱۰). بنابراین شاید شیوع نمای مختلط در DIF-SS به این دلیل باشد که اغلب بیماران مورد مطالعه، در هنگام انجام بررسی در مرحله آغازین از سیر پمفیگوئید بوده‌اند و تا آن زمان آنتی‌بادیها تنها علیه BP Ag 2 ساخته شده‌اند.

بالاخره این احتمال را نمی‌توان از نظر دور داشت که شاید در بیماران ایرانی آنتی‌ژنهای دیگری در پاتوژنز پمفیگوئید نقش داشته باشند. برای اثبات این فرض و سایر فرضیات مطرح شده کاربرد روشهای جدیدتری مانند ایمونوبلات و ELISA ضروری بنظر می‌رسد.

برای دو مورد از بیماران با نمای درمال، تشخیص نهایی EBA داده شد (بیماران ۹ و ۱۲). در هر دو بیمار تظاهر بالینی اولیه شبیه BP بود ولی بعداً در سیر آنها ضایعات تاولی مکانیکی مشاهده شد. در دو بیمار دیگر که نمای درمال داشتند (بیماران ۸ و ۱۰)، حتی با در نظرگرفتن تمام یافته‌های بالینی و آسیب‌شناسی، نتوانستیم قطعاً بین BP و EBA افتراق دهیم. به نظر می‌رسد در سه بیمار یافته‌های آسیب‌شناسی نقش اصلی را در تشخیص ایفا نمودند. در بیمار شماره ٤ لیکن پلان پمفیگوئید (LPP)، در بیمار شماره ٥ LABD و در بیمار شماره ۷ اریتم مولتی فرم تشخیص داده شد. در این سه بیمار DIF-SS در رسیدن به تشخیص کمک زیادی نکرد.

در این مطالعه نتایج DIF-SS در بیماران مبتلا به پمفیگوئید با توجه به شیوع نمای مختلط نسبت به اپیدرمال،

با نتایج مطالعات قبلی متفاوت است. جهت تائید یا رد نتایج بدست آمده، انجام مطالعاتی با حجم نمونه بیشتر و کاربرد روشهایی چون ایمونوبلات، ELISA و ایمونوالکترون میکروسکوپی علاوه بر ایمونو فلورسانس توصیه می‌شود. در برخورد با بیماران SABD در اغلب موارد یافته‌های بالینی، آسیب شناسی و ایمونوفلورسانس برای تشخیص کفایت می‌کنند و یافته‌های DIF-SS آنها نقش تعیینی دارند. ولی در تعداد کمی از این بیماران (بخصوص بیمارانی که در IF-SS نمای درمال را نشان می‌دهند) برای رسیدن به تشخیص قطعی باید از روش‌های تشخیصی پیچیده‌تری همچون ایمونوبلات، ELISA و ایمونوالکترون میکروسکوپی استفاده نمود.

Archive of SID

جدول شماره ۱- مقایسه تشخیص‌های آسیب‌شناسی، DIF-SS و نهایی ۱۷ بیمار مبتلا به بیماریهای تاولی ساب اپیدرمال

	تشخیص افتراقی اولیه بالینی	تشخیص آسیب‌شناسی	نتیجه DIF-SS	تشخیص نهایی
1	BP,EBA	BP (EBA رد شود)	C	BP
2	BP,PV	BP	C	BP
3	BP	BP	C	BP
4	BP,LPP,MFB	LP	C	LPP
5	BP, VAS,EM	LABD	C	LABD
6	BP,LABD,EBA,PV	BP	E	BP
7	BP,EM,CBDC	EM نمی‌توان BPرا رد کرد	E	EM
8	BP	BP یا EBA	D	BP لوکالیزه EBA،
9	PV,BP	SEB غیرالتهابی	D	EBA
10	TEN,SJS,PV,BP	SEBغیرالتهابی	D	BP,EBA
11	BP,EBA,PV,FDE	SEB neut. + eos	C	BP
12	PV,BP,LABD, EBA, DH	SEBغیرالتهابی EBA ردمی‌شود	D	EBA
13	BP,EBA	BP یاEBA	C	BP
14	EM,BP,DH,PV	BP	C	BP
15	PV,DH,BP	BP کم سلول	C	BP
16	BP,others	BP	C	BP
17	BP,PV	BP	C	BP

BP: پمفیگوئید تاولی, C: مختلط, CBDC:chronic bullous disease of childhood, D: درمال, DH: درماتیت, EBA: هرپتیفرم , eruption, LABD: linear IgA bullous dermatosis, LPP: لیکن پلان پمفگوئید, MFB: بولوس میکوزیس فونگوئید, PV: پمفیگوس وولگاریس, SEB: تاول ساب اپیدرمال, SJS: سندرم استیونس جانسون, TEN: toxic epidermal necrolysis , VAS: واسکولیت

Archive of SID

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات قبلی

	مطالعه حاضر	مطالعه حاضر	Onodera (مرجع ٤)	Joly (مرجع ۷)	Domolge-Hultsch (مرجع ۸)	Zhu (مرجع ٥)	Ghohestani (مرجع ٦)
جمعیت مورد مطالعه (تعداد)	همه بیماران (۱۷)	بیماران پمفیگوئیدی (۱۰)	سرم بیماران پمفیگوئیدی (۱۳٥)	بیماران پمفیگوئیدی (۲۷)	بیماران پمفیگوئیدی (۱٤)	سرم بیماران پمفیگوئیدی (۱۰۰)	سرم بیماران پمفیگوئیدی (۲٦۳)
روش	DIF-SS	DIF-SS	IIF-SS	DIF-SS	DIF-SS	IIF-SS	IIF-SS
اپیدرمال	۱۲٪	۱۰٪	۸۸٪	۸۹٪	٥۷٪	۹۲٪	۹۸٪
مختلط	٦٥٪	۹۰٪	۸٪	۱۱٪	۳٦٪	۳٪	۲٪
درمال	۲۳٪	--	٤٪	--	۷٪	٥٪ (۳EBA)	--

منابع

1- Woodley DT, Sauder D, Talley MJ, et al. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. J Invest Dermatol 1983;81:149-53.

2- Gammon WR, Griggman WR, Inman AO 3rd, et al. Differentiating anti-lamina lucida and anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. J Invest Dermatol 1984;82:139-44.

3- Gammon WR, Kowalewski C,Chorzelski TP, et al. Direct immunofluorescence studies of sodium chloride-separated skin in the differential diagnosis bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. J Am Acad Dermatol 1990;22:664-70.

4- Onodera Y, Shimizu M, Hashimoto T, et al. Differences in binding sites of autoantibodies against 230-and 170-Kd bullous pemphigoid antigens on salt-split skin. J Invest Dermatol 1994;102:686-90.

5- Zhu XJ Nimi Y, Bystryn JC. EBA incidence in patients with basement membrane antibodies. Arch Dermatol 1990;126:171-74.

6- Ghohestani R, Kanitakis J, Niculas JF, et al. Comparative sensivity of indirect immunofluorescence to immunoblot assay for the detection of circulating antibodies to bullous pemphigoid antigens 1 and 2. Br J Dermatol 1996;135:74-79.

7- Joly P, Gilbert D, Thomine E, et al. Relationship between the in vivo localization and the immunoblotting pattern of anti-basement membrane zone

Archive of SID

antibodies in patients with bullous pemphigoid. Arch Dermatol 1997;133: 719- 24.

8- Domloge-Hultsch N, Bisalburta P, Gammon WR, et al. Direct immunofluorescence microscopy of 1 mol/L sodium chloride-treated patient skin. J Am Acad Dermatol 1991;24:946-51.

9- Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, et al. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. J Immunol 1986;136:1231-35.

10-Liu Z, Diaz LA, Troy JL, et al. A passive transfer model of organ specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies against the hemidesmosomal antigen, BP180. J Clin Invest 1993;92:2480-88.