قياس مستوى (IL-1,IL-4,IL-8) لمرضى السعفة متباينة اللون[+]

THE MEASUREMENT OF (IL-1,IL-4,IL-8) LEVEL IN PATIENTS WITH *TINEA VERSICOLOR*

ماجد صخي جابر[*]

المستخلص

استخدمت طريقة ELISA لقياس مستوى الوسائط الخلوية (IL-1, IL-4, IL-8) لمرضى السعفة متباينة اللون وكان عددهم (٣٥) تراوحت اعمارهم بين (18–43) سنة ، وبمعدل (30.5) واظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي كبير P<0.0001 في مستوى (IL-1) ، وجود ارتفاع معنوي كبير P<0.0001 في مستوى (IL-4,IL-8) عند مقارنة النتائج بمجموعة السيطرة التي شملت (20) شخصا سليما تراوحت اعمارهم بين (21–35) سنة بمعدل (28).

Abstract

The level of (IL-1,IL-4,IL-8) had been measured by used ELISA method in patients with *Tinea versicolor* , this study included (٣٥) patients age range (18-43) years , mean (30.5) years . the results had been shown the presence of very significant decrease (P<0.0001) in the (IL-1) level , the presence of very significant increase (P<0.0001) in the (IL-4,IL-8) level , when a results compared to control group which included (20) healthy individuals age range (21-35) years , mean (26) years.

المقدمة

السعفة متباينة اللون مرض فطري سطحي مزمن يتميز بالطفح الذي يختلف لونه من الوردي الفاتح إلى الغامق وينتشر الطفح على الجلد الأملس للجسم مثل الأكتاف واليدين والوجه والرقبة وكذلك في المناطق الأخرى للجسم ماعدا راحة اليد وباطن القدم.ويعد المرض مشكلة من الناحية الجمالية بالإضافة إلى ذلك أن بعض الناس المصابين بالسعفة متباينة اللون يعانون من حكة شديدة [1] .

يتسبب المرض من خميرة محبة للدهون *Malassezia furfur* وهي خميرة اصلها بشري anthropophilic وتعود الى احياء الجلد الفسيولوجية اي ضمن المايكروبات الطبيعية للجلد . وتنمو بطور الخميرة وكذلك في الطور الخيطي وتكون بطور الخميرة في الجلد المصاب [2].

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٦/١٢/٢٠ ، تاريخ قبول النشر ٢٠٠٧/٥/٢٤

[*] مدرس– فرع التقنيات الكيميائية الاحيائية–قسم العلوم التطبيقية–الجامعة التكنولوجية

هنالك عدة عوامل تساعد على الإصابة أو التعرض للمرض منها المناخ الحار والرطب والتعرق الغزير والظروف الصحية الفقيرة والاصابة بالامراض الخطيرة مثل عوز التغذية و نقص الفيتامينات والاصابة بالامراض المزمنة وكذلك من المحتمل أن تكون الحوامل عرضة للمرض [3]. ينتشر المرض في أنحاء العالم كافة ولكنة يكثر في المناطق الاستوائية وشبة الاستوائية وهو منتشر في كلا الجنسين وفي كل العروق [4].

يصيب المرض عادة الاشخاص مابين سن البلوغ والعمر المتوسط ونادراً ما يصيب الاطفال قبل البلوغ والمرض غير شائع في كبار السن والذكور اكثر اصابة بالمرض من الاناث بنسبة (3:2)[5].إن خميرة *Malssezia furfur* لا توجد حرة المعيشة ولاتنتقل من شخص لآخر [6] و من المحتمل أن تنتقل من شخص إلى آخر بصورة مباشرة أو غير مباشرة بوساطة البشرة المتقشرة [7].

المواد وطريقة العمل

استخدمت طريقة ELISA [8] المجهزة من شركة CCI الفرنسية .

- سحبت عينات الدم الوريدي بمحقنة معقمة سعة ٥ ملليتر ووضعت في أنابيب بلاستيكية معقمة غير حاوية مانع التخثر وتركت لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة لكي تتم عملية التخثر .
- أزيلت الخثرة بوساطة العصا الخشبية وبعدها تم إجراء عملية النبذ المركزي بسرعة ٥٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق.
- تم سحب عينات المصل بوساطة ماصة باستور معقمة وحفظت بدرجة حرارة (– ٢٠) م° لحين الاستعمال.
- تم سحب ١٠٠ مايكروليتر من محلول دارئ الفوسفات (Phosphate buffer) ووضع في كل حفرة من حفر الصفيحة البلاستيكية الخاصة بعدة القياس.
- أضيف ٢٠ مايكرو ليتر من كل من المحلول القياسي (Standard) وعينات السيطرة (Controls) وعينات المرضى (Samples) إلى الحفر.
- غطيت الصفيحة البلاستيكية بشريط لاصق ، ورجت افقيا بقوة ٣٠٠ دورة / دقيقة لتجانس المحاليل ، ثم حضنت لمدة (٩٠) دقيقة بدرجة حرارة (٣٧) م° في هذه الخطوة يفترض أن يحصل ترسيب للحركيات الخلوية (Cytokines) المتفاعلة مع المادة المتخصصة لها (في الحالات الايجابية) مغطية قاع الحفر .
- فصلت السوائل ، ثم أضيف ٣٠٠ مايكروليتر من محلول الغسل إلى كل حفرة وكررت عملية الغسل ثلاث مرات .في هذه الخطوة ستبقى الحركيات الخلوية الموجودة في عينات المرضى و السيطرة و المحاليل القياسية ملتصقا بالحفرة .
- أضيف ١٠٠ مايكروليتر من الأضداد المقترنة بانظيم acetylcholinesterase (في حال قياس IL-1) والأضداد المقترنة بانظيم Streptavidin-peroxidase (في حال قياس IL-4 و IL-8) الى كل حفرة ،ثم غطيت وحضنت لمدة ٩٠ دقيقة بدرجة (٣٧) مْ
- كررت عملية الغسل لإزالة الأضداد المقترنة بالانظيم غير المرتبطة.
- أضيف ١٠٠ مايكروليتر من المادة الملونة (Chromagen) إلى كل حفرة .

- غطيت الصفيحة البلاستيكية ثم حضنت لمدة ٣٠ دقيقة في مكان معتم وفي درجة حرارة الغرفة .
- أوقف التفاعل بإضافة ١٠٠ مايكروليتر من محلول حامض الكبريتيك (Sulfuric acid) إلى كل حفرة ورجت الصفيحة البلاستيكية افقيا بقوة ٣٠٠ دورة/دقيقة وقرأت النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي ٤٥٠ نانوميتر . الكثافة الضوئية (Optical density) تعبر عن كمية الحركيات الخلوية في العينة بوحدة (وحدة عالمية /ملليلتر) مقارنة بالكثافة الضوئية للمحاليل القياسية . تم حساب النتائج باستخدام المعادلة الاتية :

$$Y = A + BX$$

حيث أن **Y** = الكثافة الضوئية ، **X** = تركيز (مستوى) الحركيات الخلوية ، **A** = قيمة **Y** عندما تكون قيمة **X** تساوي صفر و **B** = زاوية الميل .

التحليل الاحصائي :-

حللت النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS) المحمل في الحاسبة، حيث اعتمد الاختبار {(Least Significant Difference, (LSD)} للتعرف على درجة معنوية الفروقات الملاحظة ما بين معدلات (Means) المعاملات المدروسة في الأفراد (المرضى والسيطرة).

النتائج والمناقشة :-

توضح الجداول (1)،(2) ،(3) على التوالي المستوى المصلي (المعدل ± الخطا القياسي) للحركيات الخلوية (IL-1 , IL-4 , IL-8)(وحدة دولية /ملليلتر) للمرضى مقارنة بمجموعة السيطرة.

حيث أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي كبير ($P<0.0001$) في مستوى (IL-1) في حين أظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي كبير ($P<0.0001$)في مستوى (IL-8,IL-4) عند مقارنة النتائج بمجموعة السيطرة .

جدول (1) معدل مستوى (IL-1) للمرضى مقارنة بمجموعة السيطرة

المجاميع	وحدة دولية /ملليتر				
	المعدل	الخطأ القياسي	أعلى قيمة	أقل قيمة	الاحتمالية
السيطرة العدد=20	136.37	13.86	856	101	
المرضى العدد =35	16.342	0.002	17.15 ↓	13.93 ↓	0.0001

جدول (2) معدل مستوى (IL-4) للمرضى مقارنة بمجموعة السيطرة

المجاميع	وحدة دولية /مليليتر				
	المعدل	الخطأ القياسي	أعلى قيمة	أقل قيمة	الاحتمالية
السيطرة العدد= ٢٠	32.6	0.021	47.6	2.78	
المرضى العدد =35	86.0	3.42	183 ↑	45 ↑	0.0001

جدول (٣) معدل مستوى (IL-8) للمرضى مقارنة بمجموعة السيطرة

المجاميع	وحدة دولية /مليليتر				
	المعدل	الخطأ القياسي	أعلى قيمة	أقل قيمة	الاحتمالية
السيطرة العدد=20	0.651	0.089	2.98	0.071	
المرضى العدد =35	9.2	1.136	17.2 ↑	5.32 ↑	0.0001

الحركيات الخلوية هي بروتينات سكرية تشبه الهورمونات تقوم بتنشيط وتنظيم الخلايا اللمفاوية التائية والبائية، تحوي سلسلة من الببتيدات متعددة ذات وزن جزيئي يتراوح مابين (10–50) كيلودالتون.يشير مصطلح (lymphokines) إلى الحركيات الخلوية المفرزة من قبل الخلايا اللمفاوية في حين الخلايا وحيدة النواة وخلايا البلعم الكبير تنتج (Monokines)والعديد من الحركيات الخلوية التي تفرز من قبل بعض خلايا الدم البيض تدعى الوسائط البينية (Interlukins) [8].إن وظيفة الحركيات الخلوية هي تحفيز مكونات الجهاز المناعي وتنظم الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية [9] .

هنالك دراسات مثل كدراسة [Wallace *etal*.,1999] التي أشارت إلى عدم قابلية خميرة *Malassezia* في التنظيم المناعي. حيث استخدموا الباحثون نوعين مختلفين من عالق الخميرة المعامل بالفورمالين وعالق المزرعة الخلوية حيث حضن العالقين مع خلايا(Keratinocyte) وخلايا الدم المحيطي وحيدة النواة (PBMC). حيث حددت عملية تحرير (IL-1) بأوقات مختلفة ووجد أن مستوى (IL-1) اقل من مستواه في مجموعة السيطرة . اقترح الباحثون أن النقص في مستوى (IL-1) يكون نتيجة فقدان الاستجابة الالتهابية في مرض السعفة متباينة اللون وهروب خميرة *Malassezia* من الجهاز المناعي. قام الباحث [Kesavan] وجماعته عام (1998) بدراسة تأثير ثلاثة أنواع من خميرة *Malassezia* على إنتاج الحركيات الخلوية (TNF-α,IL-6,IL- 8) بوساطة خلايا الدم المحيطي وحيدة النواة . عزلت خلايا (PBMC) من أربعة أشخاص متبرعين وزرعت مع خلايا الخميرة وبمعدلات مختلفة (1 :20 ، 1 : 10 ,1:1)على التوالي. قيس مستوى الحركيات الخلوية في عالق المزروع بأوقات مختلفة (0، 24 ، 48) ساعة. خلايا (PBMC) زرعت مع الخميرة الحية بمعدل (20:1) وحدد معدل إفراز الحركيات الخلوية بعد مرور (24) ساعة. بصورة عامة الخميرة المقتولة في طور النمو عندما تساوي خلايا (PBMC) (1:1) تؤدي إلى زيادة إفراز الحركيات الخلوية .في حين خلايا الخميرة الحية تؤدي إلى انخفاض مستوى الحركيات الخلوية مثل (TNF,IL-6,IL-1) .

من الدراسات الحديثة التي أشارت إلى تقليل إنتاج الحركيات الخلوية بوساطة خلايا (PBMC) دراسة الباحث [Kesavan *etal*.,2000] في دراستهم عوملت خلايا الخميرة في طور الثبات بمذيبات تزيل طبقة الدهون الموجودة في الجدار الخلوي، وزرعت خلايا (PBMC) مع خلايا الخميرة المعاملة وغير المعاملة بالمذيبات بمعدل (20:1) ، وحددت مستويات الحركيات الخلوية في المزرعة بعد مرور (24) ساعة حيث لوحظ أن مزرعة خلايا (PBMC) مع خلايا الخميرة المعاملة بالمذيبات أنتجت مستويات من (IL-6, IL-1B,TNF-α) مساوية أو أعلى من المستوى الطبيعي حيث أن استئصال طبقة الدهن الموجودة بالجدار الخلوي للخميرة يؤدي إلى تنشيط إنتاج الحركيات الخلوية بوساطة خلايا (PBMC).

هنالك فطريات أخرى تؤثر في عملية إنتاج الحركيات الخلوية مثل خميرة القوباء البيضاء *Candida albicans* حيث تقوم بتحفيز (TNF-α) المنتج بوساطة خلايا الدم أحادية النواة [13] الخميرة الحية تحفز على إنتاج (TNF- α) بصورة كبيرة، في حين ان خلايا الخميرة الميتة تحفز على إنتاج (IL-1) بصورة كبيرة أيضا ، بالاتجاه المعاكس هنالك دراسة أشارت إلى عدم قابلية خميرة (القوباء البيضاء) الحية والمقتولة في تحفيز الحركيات الخلوية [14].

إن تأثير خميرة *Malassezia* على إنتاج الحركيات الخلوية يكون مشابه لتأثير بعض الفطريات المرضية الأخرى مثل *Cryptococcus neoformans* حيث إن تأثير هذا الفطر على إنتاج الحركيات الخلوية بوساطة خلايا البلعم الكبير يكون متغير ويعتمد على وجود المحفظة ذات التركيب الكيميائي المتعدد السكريد ، وهذا يؤدي إلى زيادة في إفراز الحركيات الخلوية بصورة معنوية [15].

قام الباحثين[Suzuki *etal*.,2000] بعزل الخلايا وحيدة النواة ودرسوا قابليتها على إنتاج الحركيات الخلوية بمعاملتها مع خلايا خميرة *Malassezia* الحية والمقتولة ، حيث لاحظوا زيادة في إنتاج (IL-8) بينما لاحظوا أن معاملة الخلايا الحبيبية الفارزة للحركيات الخلوية عندما يتم تحفيزها باستخدام الخميرة نفسها وتحت نفس الظروف يؤدي ذلك إلى زيادة في إنتاج (IL-1α , IL-8) وهذا قد يشير إلى الاختلاف الحاصل في فعالية تلك الخلايا نتيجة للاستجابة المناعية ضد الإصابات الفطرية.

تم التحري عن مستوى الحركيات الخلوية (TNF,IL-5 ,IL-4) المفرزة من قبل خلايا (PBMC) ، والخلايا اللمفاوية التائية بعد تحفيزها باستخدام المشطرات أو باستخدام خميرة *Malassezia* . فقد وجد أن خلايا PBMC أنتجت حركيات خلوية لا يمكن قياسها أو لا يمكن التحري عنها عندما يتم تحفيزها أو تنشيطها باستخدام المشطرات، في حين الخلايا التي تم تنشيطها باستخدام الخميرة أنتجت الحركيات الخلوية (TNF, IL-5 , IL-4) بمستويات واطئة ومن الممكن ان تكون الحركيات الخلوية المفرزة من قبل الخلايا اللمفاوية عالية وتحت الظروف نفسها وباستخدام المنشطات أو المحفزات وهذا يشير إلى دور خلايا (Th2 , Th1) وقابليتها على إنتاج الحركيات الخلوية [17] .

المصادر :

1-Faergemaan,J."*Tinea versicolor*with regard to seborreic dermatitis " *Arch .Dermatol*., vol115 , pp.966-986,1999.

2-Schmidt,A."*Malassezia furfur* a fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders"*Cutis*,vol59,pp.21-24,1997.

3-Roberts, S.O.B. and Mackenzie. D. W. R. *Dermatology*,Blackwell scientific publication,London,1986.

4-Savin,R."diagnosis and treatment of *Tinea versicolor ".J .Fam. Pract.,*vol43 , pp.127-132,1996

5-Lionyle,T.,Mojnarowska,R.and Parvin , S.*Illustrated encyclopedia of dermatology*, Londan,1985.

6-Al-Rubaie ,M. *Clinco -Epidemiology study of pityriasis versicolor in Baghdad*.Msc.biology, department,University of Baghdad ,Iraq.1991.

7-Bergfeld,W.,Eleweski,B.,Hay,R."Cutaneous mycosis an update for 90s"Lancet,vol2,pp.23-29,1998.

8-Roitt,I.,Brostoff,J.and Male,D.*Immunology*,Philadelphia ,U.K.,1998.

9-Goldsby,R.Kindt,T.,and Osborne,B.*Kuby Immunology*,W.H.Freeman and company New york,2000.

10-Wallace ,M.,Bangnall,H.,and Glen,D."Isolation of lipophilic yeast in sterile peritoniasis".Lancet,vol2,pp.956-959,1999.

11-Kesavan,S.,Walters ,K.,Holland,T."The effects of *Malassezia* on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells hn vitro ".*Med.Mycol*.,vol36,pp.97-106,1998.

12- Kesavan,S.,Walters ,K.,Holland,T."The effect of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species in vitro".*Med.Mycol*.,vol38,pp.239-247,2000.

13-Jeremias,J.;Kalo-Klein,A.and Witkin ,S.S. " Individual differences in tumor necrosis factor and interleukin-1 production induced by viable and heat-Killed *Candida albicans*" *.J .Med.Vet.Mycol*., Vol.29 pp.157-163, 1991.

١٤-Taramelli,D.; Malabarba, G.;Sala,N.;Basilico,T.and Cocuzza,G. "Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia or hyphae "*.J.Med.Vet.Mycol*, Vol. 34, pp.49-56, 1996.

١٥-Vecchiarelli,A.;C.Retini,D.;Pietrella,C.;Monari,C.;Tascini,T.;Beccari ,R.and Kozel,R. "Down regulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis alpha and interleukin -1 beta secretion from human monocytes Infect" . *Immun* .,vol63.pp.2919-2923,1995.

١٦-Suzuki,T.;.Tsuzuki, N.;Ohno,Y.;Ohshima,R. ,and , Yadomae,T. "Enhancement of IL-8 production from human monocytic and granulocytic cell lins ,THP-1 and HL-60, stimulated with *Malassezia furfur*" . *Immunol. Med .Microbiol*.,vol28,pp.157-162,2000.

17-Johansson,C.;Jeddi-Tehrani,M.; Grunewald,M.;Tengvall Linder,A.; Hallden , H.and Scheyninus,A. "Peripheral blood t-cell receptor beta-chain V-repertorire in atopic dermatitis patients after in vitro exposure to *pityrosporum orbiculare* extracts" .*J.Immunol*.,vol49,pp.293-301,1999.