Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 5:37 IRST on Saturday October 31st 2020

تعیین HLA در بیماران مبتلا به آفت عودکننده دهانی

دکترعلی تقوی زنوز*- دکتر رفعت ثبوتی**- دکتر شهین جعفری***- دکتر بهروز نیک بین****

*استادیار گروه آموزشی بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز

** استادیار گروه آموزشی بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

***دانشیار گروه آموزشی بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

**** استاد گروه آموزشی ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

Title: HLA typing in patients with recurrent aphthous stomatitis

Authors: Taghavi Zenouz A. Assistant Professor*, Sobuti R. Assistant Professor**, Jafari Sh. Associate Professor**, Nikbin B. Professor***

Address: *Dept. of Oral Medicine, Facalty of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences
** Dept. of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences
*** Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences

Statement of Problem: Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is a common oral disorder that despite extensive researches, the etiology of this phenomenon is still unknown. Because this phenomenon has been observed more often in families than in individual cases, genetic influence has been investigated in most researches.

Purpose: The aim of the present study was to evaluate the association between Human Leukocyte Antigen (HLA) and aphthous stomatitis more precisely.

Materials and Methods: In this study, 60 patients with RAS were examined for HLA-A and HLA- B types and 37 of them were examined for HLA- DR and HLA-DQ types. The results were compared through Fisher test with those of 25 healthy control subjects, aged more than 30 years.

Results: A significant decrease in the frequency of some antigens such as HLA-DQW 3 and HLA-A 26 in subjects with RAS was observed. Therefore, according to the results of this study, these antigens were considered as resistant antigens to recurrent aphthous stomatitis. In contrast, there was no significant increase in the frequency of any HLA antigens in the test group, compared to the control group. This finding is in contrast with the multiple reports about Behcet's disease. (Because a high frequency of HLA-B 51 has been found in Behcet's syndrome.)

Conclusion: According to the findings of this study, it is suggested that the pathogenicity of aphthous ulcerations in Behcet's disease and recurrent aphthous stomatitis is not the same. However, further studies are necessary to prove this theory.

Key words: Human Leukocyte Antigens; Recurrent aphthous stomatitis; Behcet's disease

Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 16; No.4; 2004)

چکیده

بیان مسأله: آفت عودکننده دهانی، بیماری شایعی است که با وجود انجام تحقیقات گسترده، همچنان عوامل ایجاد آن ناشناخته باقی مانده‌اند؛ نکته‌ای که در اغلب تحقیقات به آن اشاره شده نقش بسیار مؤثر توارث در ایجاد این بیماری است.

هدف: مطالعه حاضر به منظور بررسی دقیقتر اثرات و ارزیابی وجود Human Leukocyte Antigen (HLA) مرتبط با آفت انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد- شاهدی، ۶۰ بیمار مبتلا به آفت برای HLA- A و HLA- B و ۳۷ نفر از بین آنان برای

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 5:37 IRST on Saturday October 31st 2020

HLA- DR و HLA- DQ مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج با ۲۵ نفر افراد بالای ۳۰ سال که هرگز علائمی از آفت و یا سایر بیماریها نداشتند، با استفاده از آزمون دقیق فیشر مقایسه شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصله، نشانگر کاهش معنی‌دار در فراوانی برخی از آنتی‌ژن‌ها بخصوص HLA-DQW3 و HLA- A26 در گروه مورد بود؛ بنابراین بر حسب مطالعه حاضر، آنتی‌ژن‌های یادشده به عنوان آنتی‌ژن‌های مقاومت در برابر ابتلا به آفت عودکننده دهانی مطرح می‌باشند؛ اما در مقابل افزایش معنی‌داری در فراوانی هیچ‌یک از آنتی‌ژن‌های HLA در گروه بیماران نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد. لازم به ذکر است که این نکته بر خلاف گزارشهای متعدد در مورد بیماری بهجت می‌باشد. (در مبتلایان به بهجت اغلب افزایش فراوانی آنتی‌ژن HLA-B51 گزارش شده است.)

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این مطالعه، پاتوژنز ایجاد آفت در بیماری بهجت و آفت عودکننده دهانی متفاوت می‌باشد؛ البته برای اثبات این نظریه (عدم ارتباط این دو نوع آفت) انجام مطالعات دقیقتر ضروری است.

کلید واژه‌ها: آنتی‌ژن سلول‌های سفید انسانی HLA- آفت عودکننده دهانی- بیماری بهجت

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۶، شماره ۴، سال ۱۳۸۲)

مقدمه

آفت عودکننده دهانی، یک ضایعه شایع دهـان است که طبق یک گزارش ۲۰٪ از افراد جامعه به آن مبتلا هستند (۱). گرچه عوامل ایجاد این بیماری تاکنون ناشناخته باقی مانده است؛ اما یکی از مستندترین عواملی که می‌تواند نقش بسیار مهمی در این زمینه ایفا کند، توارث می‌باشد؛ بدین معنی که احتمال بروز آفت در کودکان با والدین مبتلا، بسیار بیشتر از فرزندان والدین سالم است (۲).

به منظور تأیید اثر توارث در بروز آفت، مطالعات گسترده‌ای بر روی آنتی‌ژن‌های اختصاصی HLA (Human Leukocyte Antigens) انجام شده که با توجه به موقعیت جغرافیایی و نژادهای مختلف، نتایج متفاوتی به دست آمده است؛ به عنوان مثال در مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به آفت در یونان، افزایش معنی‌داری در فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA-A2, B12 & DR3 در مبتلایان مشاهده شد و این هاپلوتیپ به عنوان یک شاخص بیماری معرفی گردید (۳). تحقیق دیگر حاکی از افزایش فراوانی HLA-B51 در مبتلایان به آفت بود (۴)؛ در مطالعه‌ای دیگر بر روی مبتلایان به بیماری سلیاک، مشخص گردید که آنتی‌ژن‌های HLA-DRW10-DRW1 در دسته‌ای از این بیماران که همزمان دچار آفت نیز بوده اند، فراوانی بیشتری داشته‌اند (۵).

گزارشهای فوق در عین تفاوت در نتایج، نوعی خاص از آنتی‌ژن‌های HLA را به عنوان HLA مسؤول در ابتلا به آفت عودکننده دهانی معرفی نموده‌اند. اما در مقابل، برخی تحقیقات دیگر، نشانگر کاهش فراوانی بعضی از آنتی‌ژن‌های HLA در بیماران آفتی بوده‌اند؛ در یک بررسی، کاهش فراوانی آنتی‌ژن HLA-DR4 در مبتلایان مشاهده شد و این آنتی‌ژن به عنوان HLA مقاومت در برابر ابتلا به آفت معرفی گردید (۶).

با توجه به نتایج متفاوت مطالعات قبلی، تحقیق حاضر به منظور بررسی وجود HLA مرتبط با آفت عودکننده دهانی در نمونه‌ای از جامعه ایران انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه مورد- شاهدی، ۶۰ بیمار (۲۶ مرد و ۳۴ زن) مراجعه‌کننده به بخش بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، برای تعیین آنتی‌ژن‌های HLA-A, B, C, DR & DQ در آزمایشگاه ایمونوژنتیک همان دانشگاه، مورد بررسی قرار گرفتند. این

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 5:37 IRST on Saturday October 31st 2020

افراد دارای سابقه آفت ۵ ساله یا بیشتر و فاقد علائمی از سایر بیماریها نظیر بیماری بهجت بودند. معیار اطمینان از صحت سابقه آفت در هر یک از بیماران، مشاهده حداقل یک بار آفت دهانی در طی معاینات بود؛ همچنین ۲۵ نفر که سن آنها بیشتر از ۳۰ سال بود و هرگز علائمی از آفت و یا سایر بیماریها نداشتند، به طور تصادفی و به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.

با توجه به مشکلات تکنیکی در انجام آزمایش HLA-DR و DQ در بار اول آزمایش، تنها در ۲۲ نمونه، نتیجه قابل بررسی به دست آمد؛ به همین دلیل از بقیه بیماران برای ارزیابی مجدد، دعوت شد که با مراجعه ۱۵ نفر، تعداد نمونه‌های HLA-DR و DQ به ۳۷ مورد رسید؛ سایر بیماران برای تکرار آزمایش مراجعه نکردند. (۶۰ بیمار برای HLA-A,B و C و ۳۷ نفر از بین همان افراد برای HLA-DR و DQ مورد بررسی قرار گرفتند).

برای انجام آزمایش برای هر مورد، حدود ۲۰ میلی‌لیتر خون وریدی گرفته شد و به منظور جلوگیری از لخته‌شدن بلافاصله در یک ارلن مایر حاوی ۸-۶ گلوله شیشه‌ای به ابعاد ۲ میلی‌لیتر ریخته شد. برای جدا کردن فیبرین از خون، ۱۵-۱۰ دقیقه ارلن مایر گردانده شد و بدین ترتیب خون فاقد فیبرین و پلاکت به دست آمد؛ در ضمن لنفوسیت‌ها به طور کامل حفظ شدند. این خون به اندازه حجم خود با محلول HANKS رقیق شد. دو حجم خون رقیق شده به آرامی روی یک حجم خون فایکول ایزوپک (بیوتست آلمان) ریخته شد و سپس لوله‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید و در نتیجه لنفوسیت‌ها به صورت یک لایه سفید در داخل لوله روی مخلوط فایکول قرار گرفت. این لایه توسط پیپت پاستور جمع‌آوری و مجدداً با محلول HANKS شسته شد و ۱۰ دقیقه بعد با دور g ۱۶۰ سانتریفوژ گردید. لنفوسیت‌ها (مجموعه لنفوسیت‌های T و B) با محلول ۱۶۴۰ RPMI (سیگما، آلمان) که دارای ۵٪ FCS بود مخلوط گردید تا حدی که تعداد سلول‌ها به ۱×۱۰ رسید. این سوسپانسیون سلولی داخل سرنگی حاوی پشم نایلون که یک بار با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۲ بار با ۲۰ میلی لیتر ۱۶۴۰ RPMI حاوی FCS (سیگما، آلمان) ۵٪ شستشو داده شده بود، ریخته شد. سرنگ به سوزن شماره G ۲۱ وصل گردید و با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۳۷°C شستشو شد. محل شسته شده که از نوک سوزن خارج می‌گردید حاوی لنفوسیت T بود و لنفوسیت‌های B به پشم نایلون چسبیده بودند که با شستشوی ۱۶۴۰ RPMI حاوی FCS ۱۰٪ از آن جدا گردید. سلول‌های B و T که در لوله‌های مجزا جمع‌آوری شده بودند، سانتریفوژ و هرکدام دو بار با محلول HANKS به مدت ۱۰ دقیقه و با دور g ۱۶۰ شسته شد. سلول‌های رسوب کرده با محلول FCS ۱۰٪ رقیق گردید تا جایی که شمارش آنها به ۲۰۰۰ سلول در هر میکرولیتر رسید. با یک سرنگ میکرولیتر (هامیلتون) داخل هر حفره از صفحات آزمایش HLA تراساکی که با روغن پارافین پر شده بودند، از سرم‌های تست HLA (بهرینگ و بیوتست، آلمان) به علاوه کنترل مثبت و منفی ریخته شد؛ سپس ۱ میکرولیتر از سوسپانسیون لنفوسیتی روی سرم تست HLA در داخل حفره‌ها ریخته و مخلوط شد. صفحه‌های حاوی لنفوسیت T برای شناسایی آنتی‌ژن‌های HLA-A,B و C به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۵-۱۵ °C و صفحات حاوی لنفوسیت B برای شناسایی انتی‌ژن‌های HLA-DR و HLA-DQ به مدت ۶۰ دقیقه در حرارت ۳۷°C نگهداری شد. ۵ میکرولیتر کمپلمان خرگوش (مؤسسه رازی) به داخل حفره‌ها اضافه و برای صفحات HLA-A,B و C، ۶۰ دقیقه و برای HLA-DR و HLA-DQ ۱۲۰ دقیقه و هر دو در حرارت ۲۵°C-۱۵ برای انجام واکنش نگهداری شدند. ۳ میکرولیتر رنگ ائوزین مایع به حفره‌ها اضافه شد و بعد از ۲ دقیقه ۸ میکرولیتر فرمالدئید (Merck، آلمان) ۳۵٪ با pH=۷ روی آنها ریخته شد. پس از ته‌نشین شدن سلول‌ها (حدود ۱ساعت) نتایج زیر میکروسکوپ

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 5:37 IRST on Saturday October 31st 2020

فاز کنتراست معکوس مطالعه گردید. سلول‌های مرده و لیز شده رنگ ائوزین را به خود جذب کردند؛ همچنین تیره و بادکرده شدند؛ این امر گویای واکنش مثبت بود ولی سلول‌های زنده رنگ را جذب نکردند و شفاف و کوچکتر دیده شدند که نشان‌دهنده واکنش منفی بود؛ در ضمن در کنترل مثبت، ۸۰ تا ۱۰۰٪ سلول‌ها و در کنترل منفی، حداکثر ۱۰٪ سلول‌ها مرده بودند. واکنشی که در آن میزان سلول‌های مرده نسبت به کنترل ۳۰٪ بیشتر بود، مثبت تلقی گردید.

به منظور بررسی ارتباط بین فاکتورهای آنتی‌ژن در دو گروه مورد و شاهد از آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

یافته‌ها

شصت بیمار مبتلا به آفت برای آنتی‌ژن‌های HLA-A,B و C و ۳۷ نفر از آنان برای آنتی‌ژن‌های HLA-DR و HLA- DQ بررسی شدند.

به طور کلی در گروه مورد فراوانی هیچ‌یک از آنتی‌ژن‌های HLA نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری نداشت؛ اما در مورد آنتی‌ژن‌های HLA-A28، HLA-B12، HLA-B21، HLA-DQW2 و HLA-DQW3 میزان در گروه شاهد به طور معنی‌داری بیش از گروه مورد بود (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA در دو گروه مورد و شاهد

نوع آنتی‌ژن	گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	P-value
A28	۲ (۳/۴)	۷ (۲۹/۲)	<۰/۰۰۲
B12	۰ (۰)	۳ (۱۲/۵)	<۰/۰۲
B21	۰ (۰)	۳ (۱۲/۵)	<۰/۰۲
DQW2	۳ (۸/۱)	۸ (۳۳/۳)	<۰/۰۲
DQW3	۶ (۱۶/۲)	۱۷/(۷۰/۸)	<۰/۰۰۰۱

بحث

نتایج بررسی حاضر بر خلاف اغلب تحقیقات قبلی، کاهش فراوانی آنتی‌ژن‌های HLA-A28, B12, DQW2 و DQW3 را نسبت به گروه شاهد نشان داد؛ نتایج مطالعات قبلی نشانگر افزایش فراوانی HLA-A2, B12 & DR3 (۳) و یا HLA-B51 (۴) بودند؛ البته تحقیق دیگری کاهش فراوانی آنتی ژن HLA-DR4 را اعلام کرد (۶). تفاوت در نتایج حاصله از بررسیهای متعدد را می‌توان به اختلاف در نژاد و وضعیت ژنتیکی متفاوت گروههای مختلف مورد بررسی نسبت داد.

در تحقیق حاضر، با ارزشترین نتیجه، کاهش HLA-DQW3 بود؛ زیرا برای ارزیابی این آنتی‌ژن از آنتی‌سرم‌های متعدد و بسیار حساس استفاده شد که نتیجه منفی آنها بسیار با ارزش است (تقریباً موارد منفی کاذب وجود نداشت)؛ همچنین معنی‌دارترین اختلاف مربوط به این آنتی‌ژن بود؛ ۱۶/۲٪ در گروه مورد در مقابل ۷۰/۸٪ در گروه شاهد (P<۰/۰۰۰۱). سایر موارد با اهمیت به ترتیب شامل HLA-A28, B12, B21 & DQW2 بود.

بنابراین بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، آنتی‌ژن‌های HLA-DQW3, A28 & B12 می‌توانند به عنوان آنتی‌ژن‌های مقاومت در برابر ابتلا به آفت عودکننده دهانی مطرح باشند؛ به عبارت دیگر افراد دارای این آنتی‌ژن‌ها، نسبت به ابتلا به آفت مقاومتر و افراد فاقد آنها، مستعدتر هستند.

همچنین در این بررسی، هیچ‌یک از آنتی‌ژن‌های HLA نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان ندادند؛ به عبارت دیگر HLA استعداد ابتلا به بیماری یافت نشد؛ لازم به ذکر است که این مورد، با نتیجه بررسیهای متعددی که برای HLA استعداد ابتلا به بهجت انجام شده، متفاوت می‌باشد. بسیاری از این تحقیقات نمایانگر افزایش فراوانی HLA-B51 در مبتلایان به بهجت بوده‌اند (۸،۷)؛ به همین دلیل به نظر می‌رسد الگوی HLA استعداد ابتلا به بیماری در آفت و بهجت متفاوت باشد؛ شاید بتوان چنین نتیجه‌گیری

کرد که پاتوژنز ایجاد آفت نیز در بیماریهای بهجت و آفت عودکننده دهانی متفاوت است؛ البته برای تأیید این نظریه (عدم ارتباط این دو نوع آفت) به مطالعات دقیقتری نیاز است.

منابع:

1- Bimbaum W, Dunne S. Oral Diagnosis: the clinician's guide. 1st ed. Oxford: Wright pub; 2000: Chapt 10:207.

2- Miller M, Garfunker A, Ram C. The inheritance of recurrent aphthous stomatitis observation on Susceptibility. Oral Surg 1980; 49(5): 409.

3- Kayavvis I, Polymmenidis Z, Papanyotoou P. Hyperhoplotypes of A, B and DR loci of HLA region in patients with recurrent ulceration. Hell Stomatol Chron 1990; 34(1):17.

4- Shohat R, Zabarski M, Kalderon S. Close association of HLA-B51 in persons with aphthous stomatitis. Oral Surg Oral Path 1992; 74(4): 455.

5- Couzigou P. High prevalence of DRW10 and DRW1 antigens in celiac disease associated with recurrent aphthous stomatitis. J Oral Path 1993; 88(6): 972.

6- Sun A, Lin S, Chu C. HLA-DR antigens in Chinese patients with Behcet's disease. J Oral Path 1993; 22 (2): 60.

7- Kera J, Mizuki N, Ota M. Significant association of HLA-B5101 and B5108, and lack of association class II alleles with Behcet's disease in Italian patients. Tissue Antigens 1999; 54 (6): 565.

8- Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y. HLA class I genotyping including HLA-B51 alleles typing in the Iranian patients with Behcet's disease. Tissue Antigens 2001; 57(5): 457.

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 5:37 IRST on Saturday October 31st 2020