

بررسی میزان سرمی ایمونوگلوبولینهای IgG, IgM, IgA, IgE و شمارش لنفوسیت‌های B(CD22+) (در بیماران مبتلا به بیماری بهجت در ایران)

دکتر مجید ریانی، متخصص ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تهران
دکتر احمد مسعود، استاد گروه ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تهران
دکتر فریدون دواجی، استاد گروه روماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تهران

STUDY OF IMMUNOGLOBULINS IgG, IgM, IgA AND IgE LEVELS IN SERUM AND ENUMERATION OF B (CD22⁺) CELLS IN IRANIAN PATIENTS WITH BEHCET'S DISEASE ABSTRACT

The Behcet disease (BD) is a systemic inflammatory disease of unknown etiology. Evidences suggest that at least some of the clinical aspects of the BD may be due to autoimmune responses, these includes elevated leveles of immunoglobulins(Igs) and immune complexes.

To clarify the molecular basis of the changes in the level of different classes of Igs in BD, we have detected the amount of IgG, IgM, IgA, IgE and number of B-cells (CD22⁺) in 68 patients with BD, 28 patients controles (PC) and 30 normal controls(NC). The amount of IgA(P=0.0007), IgM(P<0.000001) and IgE (P=0.005) shows a significant changes in BD to comparied with the NC. But IgG levels don't show any difference. The number of B-cells(CD22⁺) have not show any changes in BD in comparied to NC and PC.

It seems that the elevation of different Igs levels in the serum of patients may be due to unknown polyclonal stimulations then the elevation of Igs caused the CIC formation and complement activation which followed by tissue damages in BD patients.

چکیده

سلولهای B(CD22+) هیچگونه تغییری مشاهده نشد. لذا می‌توان چنین استنباط نمود که تحریکات ناشناخته و پلی‌کلونال سلولهای B خاص، موجب افزایش غلظت سرمی IgE, IgM, IgA در این بیماران شده که به نوع خود موجب تشکیل CIC و فعال سازی کمپلمان و ایجاد ضایعات نسجی در بیماری بهجت می‌گردد.

مقدمه

بیماری بهجت (BD) یک بیماری سیستمیک غیر معمول است که اساساً توسط ضایعات دهانی عود کننده (recurrent aphthous) تناسلی و اوئیت (uveitis) و ضایعات سیستمیک متنوع دیگر مشخص می‌گردد. به علت عدم وجود

بیماری بهجت یک بیماری سیستمیک با اتیولوژی نامشخص می‌باشد ولی شواهد، سیستم ایمنی را در پاتوژنز بیماری دخیل دانسته است، بطوریکه ممکن است پاسخ‌های اتوایمیون، افزایش میزان ایمونوگلوبولین‌ها و ظهور کمپلکس‌های ایمنی باعث بروز علائم بالینی در این بیماری گردد. در مطالعات مقادیر سرمی ایمونوگلوبولینهای مختلف نظیر IgE, IgM, IgG, IgA و شمارش لنفوسیت‌های B(CD22+) در ۶۸ بیمار مبتلا به بیماری بهجت، ۲۸ بیمار مبتلا به دیگر بیماری‌های کلاژن و ۳۰ فرد طبیعی اندازه‌گیری شده است که نتایج حاکی از افزایش قابل توجه مقادیر IgE(P=۰/۰۰۰۵), IgM(P<۰/۰۰۰۰۰۱), IgA(P=۰/۰۰۰۰۷) در بیماران بهجت در مقایسه با افراد طبیعی می‌باشد. در تعداد

روش تهیه سرم

پس از انعقاد نمونه های خون دردمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه، توسط سانتریفوژ (دور ۲۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه) سرمها جدا گردید و تمام نمونه ها در فریزر ۲۰ درجه سانتیگراد جهت انجام آزمایشات متعدد منجمد شدند. در اندازه گیری میزان IgM, IgG, IgA از تکنیک ایمنونودیفوزن شعاعی (single radial immunodiffusion) (V) و در تعیین میزان IgE از روش ELISA استفاده شد. واحد اندازه گیری در مورد IgM, IgG, IgA میلی گرم به ازای دسی لیتر (mg/dl) و در مورد IgE از واحد بین المللی (IU/ml) بود.

روش تهیه سلول

پس از گرفتن نمونه های خون در لوله های محتوی هپارین (۵۰۰۰ U/ml)، با استفاده از فایکل، گلبولهای سفید خون جدا گردید. جهت شمارش لنفوسیت های B از منوکلونال آنتی بادی حاوی Anti-CD22 استفاده شد (V). شمارش سلولها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس، لام توما و شمارشگر دستی انجام گردید.

روش آماری

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ اعلام گردید، روش آماری که در این مطالعه جهت مقایسه نتایج به کار برده شده است روش آزمون t دانشجویی (t-student) بوده است.

جدول شماره (۱): مشخصات و تشخیص نهایی بیماران

مشکوک به بیماری بهجت

| تشخیص نهایی | مرد | زن | جمع |
|---------------------|-----|----|-----|
| بیماری بهجت | ۳۳ | ۳۵ | ۶۸ |
| افتوز دهان و تناسلی | ۶ | ۱۰ | ۱۶ |
| اووئیت | ۴ | ۸ | ۱۲ |
| جمع | ۴۳ | ۵۳ | ۹۶ |

نتایج

نتایج تعیین میزان غلظت IgE, IgM, IgG, IgA در سرم بیماران مبتلا به بهجت با افراد طبیعی در جدول شماره ۴ و با بیماران کنترل در جدول شماره ۵ و شمارش درصد لنفوسیت های B (CD22+) در بیماران مبتلا به بهجت در مقایسه با افراد کنترل بیمار و افراد طبیعی در جداول ۶ و ۷ ارائه می گردد.

غلظت IgA در سرم بیماران مبتلا به بهجت به میزان قابل توجهی بالاتر از IgA افراد طبیعی ($P=0/00007$) می باشد اما در مقایسه با میزان IgA در بیماران کنترل تفاوتی را نشان نمی دهد.

نتیجتهای آزمایشگاهی قابل اعتماد، تشخیص بیماری بهجت بسیار مشکل است.

ایتنولوژی بیماری بهجت نامشخص است ولی محققین، سیستم ایمنی را در پاتوژنز بیماری دخیل می دانند (۲،۱). در تحقیقاتی که توسط Lehner (1978, 1977) انجام شد، ضایعات مفصلی، جلدی، عصبی و عروقی در بیماران بهجت را به علت وجود ایمنون کمپلکسهای محلول (circulating immune complexes=CIC) در جریان خون اعلام نمودند (۳) که می توانند طی فرآیند خاصی در بافتهای مختلف رسوب نمایند (۴). لازمه تشکیل CIC، تولید ایمنوگلوبولینهای مختلف در مقیاس نسبتاً زیاد می باشد. با مطالعه ایمنوگلوبولینها و اندازه گیری میزان آنها در سرم بیماران بهجت شاید بتوان تا اندازه ای تغییرات پاتولوژیک بیماری را بررسی و ارزیابی نمود. همچنین پیشنهاد شده است که IgE نیز در ایمنونوپاتوژنز بیماری بهجت دخیل می باشد (۳). به طوری که در ضایعات دهانی و خون محیطی بیماران مبتلا به بهجت لنفوسیت های دارای گیرنده IgE, IgD یافت شده است (۵).

در مورد تغییرات لنفوسیت های B در این بیماران گزارشات در دست است که حاکی از افزایش تعداد سلولهای B که به طور خود بخودی ایمنوگلوبولین ترشح می کنند، می باشد (۶). با مشاهده نتایج ضد و نقیض تصمیم گرفتیم تا غلظت سرمی IgA, IgE, IgM, IgG و همچنین تعداد سلولهای B را در بیماران مبتلا به بهجت تعیین نمائیم و نتایج حاصله با افراد کنترل سالم و بیمار مقایسه آماری نمائیم.

بیماران و روش کار

کلیه آزمایشات ایمنونولوژیک در گروه ایمنونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران بر روی نمونه خون بیماران انجام گردید. نمونه گیری از خون محیطی ۹۶ بیمار مشکوک به بیماری بهجت که برای اولین بار به بخش روماتولوژی بیمارستان شریعتی مراجعه نموده بودند، انجام گرفت. بیماری بهجت در ۶۸ نفر از افراد فوق پس از انجام معاینات بالینی تأیید گردید. ۳۵ نفر از بیماران زن و ۳۳ نفرشان مرد بودند، سن متوسط آنها ۲۶/۱ سال (۱۹-۵۹ سال) بود. از ۲۸ بیمار باقی مانده ۱۶ نفر مبتلا به افتوز دهانی و تناسلی و ۱۲ نفر مبتلا به اووئیت بودند. در واقع بیماری بهجت نداشتند. لذا به عنوان گروه کنترل بیمار، مورد مطالعه قرار گرفتند. مشخصات بیماران در جدول شماره ۱۱ ارائه می گردد. کلیه آزمایشات به طور همزمان نیز بر روی ۳۰ فرد طبیعی انجام گردید. کلیه بیماران و افراد طبیعی از نظر سابقه آلرژی و عفونتهای انگلی مورد بررسی قرار گرفتند که همگی فاقد هر گونه آلرژی و یا بیماری انگلی بودند. علائم کلی بیماران مبتلا به بیماری بهجت در این مطالعه در جدول شماره ۲ ارائه می گردد.

جدول شماره (۳): علائم پاراکلینیکی بیماران بهجت

| علائم پاراکلینیکی | تعداد | درصد |
|-------------------|-------|-------|
| تست جلدی مثبت | ۳۰ | ۴۴/۱۱ |
| HLA-B5 مثبت | ۲۸ | ۴۱/۱۷ |
| HLA-B27 مثبت | ۹ | ۱۳/۲ |

غلظت IgM در سرم بیماران افزایش قابل توجه ($P < 0/000001$) در مقایسه با افراد طبیعی نشان می‌دهد ولی در مقایسه با بیماران کنترل تفاوتی مشاهده نمی‌گردد.

جدول شماره (۲): علائم کلینی بیماران مبتلا به بیماری بهجت در این مطالعه

| علائم بیماری بهجت در ۶۸ بیمار | تعداد | درصد |
|-------------------------------|-------|-------|
| علائم مخاطی: | | |
| ۱- آنتوز دهانی | ۶۴ | ۹۴/۱ |
| ۲- آنتوز تناسلی | ۴۳ | ۶۳/۲ |
| علائم پوستی | | |
| ۱- فولیکولیت | ۴۷ | ۶۹/۱ |
| ۲- اریتم گرهی | ۱۴ | ۲۰/۵ |
| علائم چشمی: | | |
| ۱- اووئیت قدامی | ۲۹ | ۴۲/۶ |
| ۲- اووئیت خلفی | ۱۳۱ | ۴۵/۶ |
| ۳- واسکولیت رتین | ۱۷ | ۲۵/۰ |
| ۴- کاتاراکت | ۴ | ۵/۹ |
| ۵- کزوفونکتویت | ۱ | ۱/۵ |
| ۶- پان اووئیت | ۱۰ | ۱۴/۷ |
| علائم عصبی: | | |
| ۱- علائم مرکزی | ۲ | ۳/۰ |
| ۲- سردرد | ۲ | ۳/۰ |
| علائم مفصلی: | | |
| ۱- آرترالژی | ۷ | ۹/۰/۲ |
| ۲- منوآرتریت | ۷ | ۱۰/۲ |
| ۳- اولیکوآرتریت | ۲ | ۳/۰ |
| ۴- پلی آرتریت | ۱۷ | ۲۵/۰ |
| ۵- اسپوندیلیت | ۲ | ۳/۰ |
| علائم دیگر: | | |
| ۱- فلجیت | ۶ | ۸/۸ |
| ۲- بریکاردیت | ۱ | ۱/۵ |
| ۳- اورکیت | ۳ | ۴/۵ |
| ۴- ادم اندام تحتانی و واریس | ۱ | ۱/۵ |
| ۵- تورم دو زانو | ۱ | ۱/۵ |
| ۶- تورم مچ پا | ۱ | ۱/۵ |

جدول شماره (۴): نتایج حاصله از تعیین میزان غلظت،

IgM, IgE, IgG در بیماران بهجت، کنترل و افراد طبیعی

| Igs | بیماران بهجت | کنترل طبیعی | بیماران کنترل |
|-----|--------------|-------------|---------------|
| IgG | ۱۴۷۰+۳۷۴ | ۱۴۴۸+۳۲۸ | ۱۴۴۷+۴۳۱/۷۵ |
| IgA | ۳۶۹+۱۵۷/۵ | ۲۵۵/۳+۱۲۷/۵ | ۳۶۶/۳۵+۱۲۲/۸ |
| IgM | ۲۷۴+۱۱۴ | ۱۴۷+۷۳/۸ | ۲۶۸+۸۰/۸۶ |
| IgE | ۱۵۱/۲۷+۱۳۶/۶ | ۷۷/۶۳+۶۱ | ۱۳/۵/۱+۱۳۰/۴۳ |

جدول شماره (۵): مقایسه آمار و نتایج تعیین میزان IgG,

IgA, IgE, IgM در بیماران بهجت با افراد طبیعی

| مقدار P | ایمونوگلوبولین: |
|----------------|-----------------|
| غیر معنی دار | IgG |
| $P = 0/00007$ | IgA |
| $P < 0/000001$ | IgM |
| $P = 0/0005$ | IgE |

جدول شماره (۶): مقایسه آماری و نتایج میزان IgG, IgM,

IgE, IgA در بیماران بهجت با بیماران کنترل

| نتایج آماری | ایمونوگلوبولین |
|--------------|----------------|
| غیر معنی دار | IgG |
| غیر معنی دار | IgA |
| غیر معنی دار | IgM |
| غیر معنی دار | IgE |

جدول شماره (۷): نتایج و مقایسه آماری شمارش لنفوسیت‌های

(CD 22+) B در بیماران بهجت با افراد طبیعی

| نتیجه آماری | کنترل طبیعی | بیماران بهجت |
|--------------|-------------|--------------|
| غیر معنی دار | ۱۱۰۳ | ۱۰۳۹,۲۳۴ |

جدول شماره (۸): نتایج و مقایسه آماری شمارش لنفوسیت‌های B(CD22+) در بیماران بهجت با کنترل بیمار

| نتیجه آماری | کنترل بیمار | بیماران بهجت |
|-----------------|-------------|--------------|
| non significant | ۱۱۰۳/۶۲ | ۱۰۳۹/۲۳۴ |
| B(CD22+) | | |

غلظت سرمی IgE در بیماران بهجت افزایش قابل توجهی (P=۰/۰۰۵) در مقایسه با افراد طبیعی نشان می‌دهد در حالی که با میزان IgE سرمی بیماران کنترل تفاوتی مشاهده نمی‌گردد. در میزان IgG هیچگونه تغییری در بیماران مبتلا به بهجت و بیماران کنترل در مقایسه با افراد طبیعی وجود ندارد.

بحث

در سال ۱۹۶۳ Oshima و همکاران او آنتی‌بادیهایی را بر علیه مخاط انسان در ۴۲ درصد از ۴۰ بیمار مبتلا به بهجت مشخص نمودند (۸). سالها بعد O, Duffy افزایش IgM و IgA را گزارش نمود. در این گزارش کاهش قابل توجه IgA ترشحی در بزاق ۲ بیمار مبتلا به بیماری بهجت جالب توجه بود (۸). چنین گفته می‌شود که IgA ترشحی در دفاع میزبان در سطوح مخاطی اهمیت زیادی دارد و به همین جهت حدس زده می‌شود که به علت نقص در میزان IgA ترشحی و اتصال آن، به عوامل آنتی‌ژنیک و ویروسها قادرند از سطوح مخاطی حفره دهانی عبور کرده، باعث ایجاد بیماری بهجت شوند (۸).

در سال ۱۹۷۲ Lehner افزایشی را در میزان IgM, IgG, IgA در زمان عود بیماری بهجت اعلام نمود که پیشنهاد کننده افزایش فعالیت لنفوسیت‌های B بود (۲). نتایج حاصله از مطالعات ما حاکی از افزایش غلظت سرمی IgM, IgA و IgE در بیماران مبتلا به بهجت در مقایسه با افراد طبیعی می‌باشد ولی غلظت IgG سرمی تغییری را نشان نمی‌دهد. از طرف دیگر هیچگونه تفاوتی در غلظت ایمنوگلوبولین‌های فوق بین بیماران بهجت و بیماران کنترل وجود ندارد. در مطالعات ما افزایش میزان IgE سرمی در بعضی از بیماران افزایش نشان می‌دهد (۹). با مشاهده افزایش در میزان IgE در این بیماران این فرضیه قوت گرفت که ممکن است IgE در ایمنو پاتوژن ضایعات بیماری شرکت داشته باشد (۱۰). به طوری که با مطالعات بافت‌شناسی ضایعات اولیه مخاطی و جلدی در بیماران، ارتشاح mast cells نیز مشاهده شده است (۱۱).

در مطالعات ما تعداد سلول‌های B هیچگونه تغییری را نشان نمی‌دهد در حالی که گزارشاتی حاکی از افزایش تعداد لنفوسیت‌های B که به طور خود بخودی ایمنوگلوبولین ترشح می‌کنند، وجود دارد. از طرفی کاهش در پاسخ دهی سلول‌های B

به میتوزهای غیر وابسته به T مشاهده می‌گردد. همچنین سلول‌های B موجود در تمام بیماران مبتلا به بیماری بهجت به فعال کننده‌های پلی‌کلونال وابسته به سلول T نظیر PWM پاسخ نمی‌دهند. این مشاهدات نشانگر ناهنجاری سلول‌های B می‌باشد (۱۰). در مطالعات اخیر صحبت از ناهنجاری در فعال سازی سلول B و ایمنوگولاسیون مستقیم مربوط به سلول‌های T است که می‌تواند در پاتوژن بیماری بهجت دخیل باشد (۶). افزایش سطح سرمی ایمنوگلوبولین‌ها و تولید آنتی‌بادی‌های اتوراکتیو و حضور CIC در بعضی از بیماران مبتلا به فرم فعال بیماری بهجت می‌تواند مربوط به ناهنجاری‌های سلول B باشد. و از طرفی در این بیماری پلی‌کلونال اکتیواسیون سلول‌های B نیز مشاهده می‌گردد (۵) در بیماری‌های دیگر نظیر SLE مشخص شده که یک نقص اولیه در سلول B همراه با کاهش فعالیت سوپرسوری سلول‌های T ممکن است منجر به ایجاد و بقاء فعالیت بی‌نهایت پلی‌کلونال سلول‌های B گردد (۱۰).

آیا پلی‌کلونال اکتیواسیون سلول‌های B در بیماران بهجت به علت افزایش فعالیت سلول‌های T-helper و یا کاهش فعالیت سوپرسوری و یا اکتیواسیون مستقیم سلول‌های B می‌باشد؟ علت معلوم نیست (۶). علت یا علل به وجود آورنده بیماری بهجت یک راز است اما کاهش سلول‌های در حال استراحت (Resting B) و وجود سلول‌های B نسبتاً فعال شده در بیماران مبتلا به فرم فعال بیماری بهجت می‌تواند نشانگر تحریک بیش از حد سلول‌های B در vivo باشد که توسط بعضی از محرکها صورت می‌گیرد. به طوری که سلول‌های B بطور کامل به سلول‌های ترشح کننده ایمنوگلوبولین تمایز پیدا می‌کنند. در بیماران مبتلا به فرم فعال بیماری، ترکیب افزایش فعالیت سلول‌های B و نقص در سرکوب ایمنی ممکن است منجر به فعال سازی پلی‌کلونال سلول‌های B گردد (۶).

همانطور که گفته شد، در مطالعات ما مقدار IgG تغییری را نشان نمی‌دهد حال آنکه IgM و IgA بیش از حد طبیعی تولید شده است. ما نمی‌دانیم که تولید این دو نوع ایمنوگلوبولین از نوع ترشحی و یا سرمی است یا خیر. می‌تواند قابل تامل باشد. آیا بیماری مربوط به نقطه خاصی از بدن است ولی ضایعات آن به صورت منتشر بروز می‌نماید و یا بر عکس. مراکز متعددی مبتلا به ضایعات پاتولوژیک می‌گردند که سیستم تولید آنتی‌بادی را تحریک می‌کنند. در واقع تولید آنتی‌بادی‌های فوق به هیچ وجه محافظت کننده نیستند و شاید نتیجه یک عکس العمل ساده پاتولوژیک خاصی باشد که به شکل پلی‌کلونال و انتخابی بر روی سلول‌های B خاصی اثر می‌کنند. یکی از مواردی که ایمنوگلوبولین‌ها می‌توانند شرکت فعال داشته باشند، ایجاد CIC می‌باشد قابل به ذکر است که از ۶۸ بیمار مورد مطالعه،

ضایعات این بیماران مشاهده شده است (۸).
به طور خلاصه می توان چنین استنباط نمود که تحریکات ناشناخته و پلی کلونال اکتیواسیون سلولهای B خاص، موجب افزایش غلظت سرمی IgE, IgM, IgA شده است به طوری که به نوبه خود سبب تشکیل CIC و دامن زدن به فعال سازی کمپلمان و ایجاد ضایعات نسجی در بیماران مبتلا به بیماری بهجت می گردد.

۳۷ بیمار CIC بالا را نشان داده اند که ۲۰ نفر IgE بالا (۵۴٪) و ۶ نفر IgG بالا (۱۶٪) و ۱۱ نفر IgA بالا (۳۰٪) و ۱۵ نفر IgM بالا (۴۰٪) را نشان می دهند که مویذ شرکت آنتی بادیها در ایجاد CIC و شرکت CIC در پاتوژن بیماری بهجت باشد که خیلی از گرفتاریها از جمله و اسکولیت و اریتم گرهی، آرتریت و اووئیت ناشی از افزایش ایمونوگلوبولینها و متعاقب آن تشکیل CIC منی باشد. (۴). بسا بهره گیری از تکنیک ایمونوفلورسانس، رسوب IgG و IgM در دیواره عروق

مراجع

1. Aphthous stomatitis.. Behcet"s syndrome symposium.J. Oral. Pathology 1978; 7:341-440.
2. Scully C,Lehner.T. Serum salivary and lacrimal immunoglobulins in B.S and recurrent oral ulcers. Behcet's syndrome. London. Academic Press; 1979; 77-90.
3. Lehner T. Damaged membrane fragments and immune complexes in the blood of patients with Behcets syndrome. Clin.Exp.Immunof 1978; 34 : 206-212.
4. Mannik M. Mechanism of tissue deposition of immune complexes.J. of Rheumato. (suplement 13).1987;14:35-42.
5. Scully C. Immunoglobulins G,M,A,D and E in Behcet's. syndrome. Clinica. Chimica Acta.1982; 120 : 237-242.
6. Suzuk N. Abnormal B-cell function in patients with B.D. Arthand Rheumatism 1986; 29(2) : 212-219.
7. Rogers,R.S. Recurrent aphthous stomatitis: clinical characteristics and evidence for an immunopathogenesis.I.Invest.Dermatol 1977; 69:499-507.
8. Reynold.C. et al: Behcet's disease. International J of Dermato 1984; 23(1) : 25-32.
9. Lenher T. Behcet's syndrome and autoimmunity. Brith. Med. J 1967; 1: 455-467.
10. Haim S.The pathogenesis of lesion in Behcet disease.Dermatologica 1979; 158:31-37.
11. Lenher.T. Pathology of recurrent oral ulceration in B. S.ight.electron and fluorescence microscopy.J.Oral. Pathol 1969; 97:481-494.
12. Dilsen. N.Konice M.Ovul.C. Behcet's disease. Amsterdam: Excerpta Medica; international congress series 1979; 467.
13. Rose. NR SRID for immunoglobulins and complements. Manual of clinical laboratory immunology.3th edition. 1988. 139. 146-148 .178- 179. 182.
14. Stuart J et al: Behcet's disease of Am Acad of Dermatol 1988; 19 (5); part 1. 767-779.

* * *