مقاله پژوهشی

بررسی میزان میانگین درصد لنفوسیت های T گاما–دلتا در خون محیطی افراد مبتلا به بیماری سلیاک و افراد سالم در شهر اصفهان

سید علی ابطحی[۱]، سید محمدحسن امامی دهکردی[۲]، فرشته آل صاحب فصول[۳]، محسن مسجدی[۳]، علی صفائی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] فوق تخصص گوارش، گروه داخلی، بخش گوارش، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] دکتری ایمنی شناسی، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] دانشجوی دکترای داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

زمینه و هدف:
نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا به کل لنفوسیت های T دربافت اپی تلیوم روده کوچک[۱] دارای ارزش تشخیصی برای بیماری سلیاک است. هدف این مطالعه بررسی این نسبت در خون محیطی بالغین مبتلا به بیماری سلیاک و افراد سالم بود.

روش بررسی:
در این مطالعه مورد- شاهدی از افراد سالم (۲۱ نفر) و بیماران مبتلا به سلیاک در زمان تشخیص بیماری (۱۵ نفر) خونگیری شد. با روش فلوسیتومتری (Flow cytometry) نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا تعیین شد.

یافته‌ها:
اختلاف معنی داری درنسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا به لنفوسیتهای T مشاهده نشد (p value=۰/۸۴).

نتیجه گیری:
نتایج نشان می دهند که لنفوسیت های T گاما-دلتا خون محیطی جهت تشخیص بیماری سلیاک کمک کننده نیست.

کلید واژه: سلیاک، لنفوسیت های T، خون محیطی

گوارش/ دوره ۲۰، شماره ۲/ تابستان ۱۳۹۴/ ۸۹-۸۵

1. Small intestinal epithelium

زمینه و هدف:

بیماری سلیاک[۱] یک بیماری خودایمنی منحصر به فرد است که در آن مصرف گلوتن (Gluten)، که در گندم و برخی دیگر از غلات وجود دارد، باعث به وجود آمدن ضایعات التهابی در روده کوچک به خصوص در دوازدهه می گردد.(۱و۲) تشخیص دیر هنگام این بیماری با افزایش احتمال ابتلا به سرطان، اختلال در رشد و ابتلا به دیابت همراه است.(۵-۳) تهیه بیوپسی صحیح از محل ضایعات روده کوچک و بررسی آن از نظر بافت شناسی و شمارش لنفوسیت های T داخل بافت اپی تلیوم روده کوچک Intestinal Intraepithelial lymphocytes (IIEL) ارزش بالایی برای تشخیص این بیماری دارد.(۶و۷)

ولی به دلایل مشکلاتی مانند ماهیت ضایعات که به صورت تکه تکه (Patchy lesion) است و احتمال دارد در هنگام تهیه بیوپسی از قسمت های سالم نمونه گرفته شود (۱۰و ۱۱)؛ در برخی بیماران با وجود علایم بالینی و آزمون های سرولوژی مثبت ممکن است ضایعات آتروفی که مبین بیماری هستند وجود نداشته باشند(۱۲)، و همچنین آندوسکوپی و تهیه بیوپسی که یک روش تهاجمی است، محققین سعی دارند روش های دیگری جهت تشخیص بیماری سلیاک بیابند.

لنفوسیت های T، که در خون و اکثر بافت های بدن مانند پوست و روده حضور دارند، همگی دارای مارکر CD3 هستند و بر اساس نوع پذیرنده ای T Cell Receptor (TCR) که بروز می دهند، به دو نوع لنفوسیت های T دارای پذیرنده آلفا-بتا ($\alpha\beta^+$ T cell) و لنفوسیت های T دارای پذیرنده گاما-دلتا ($\gamma\delta^+$ T cell) تقسیم می شوند.(۸ و۹) جمعیت غالب لنفوسیت های T بدن را لنفوسیت های T آلفا-بتا تشکیل می دهند و لنفوسیت های T گاما-دلتا نسبت کوچک تری از لنفوسیت های T را در خون محیطی (۲۰-۰/۵٪) و بافت های پوششی مانند روده (۱۰-۳٪) به خود اختصاص می دهند.

1. Celiac Disease

نویسنده مسئول: محسن مسجدی
گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
تلفن: ۳۷۹۲۲۴۱۶-۰۳۱
نمابر: ۳۶۶۸۸۵۹۷-۰۳۱
پست الکترونیک: masjedi@med.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۰
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۴/۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵

افزایش میزان کل لنفوسیت های T داخل بافت اپی تلیوم روده کوچک در طیفی از بیماری های عفونی و التهابی دستگاه گوارش در روده کوچک، مانند بیماری سلیاک، مشاهده می گردد و از این رو، اختصاصیت آن برای بیماری سلیاک کم و در حدود ۱۰٪ است.(۱۰) از سوی دیگر دیده شده است که در بیماری سلیاک، علیرغم افزایش کل لنفوسیت های T داخل بافت اپی تلیوم روده کوچک ، نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا نیز افزایش چشم گیری در حدود ۴۰-۳۰ ٪ نسبت به ۱۰-۳٪ در حالت نرمال پیدا می کنند. همچنین به دلیل آنکه در سایر بیماری های دستگاه گوارش نسبت این سلول ها تغییر مشهودی پیدا نمی کند و معمولاً در حد نرمال باقی می ماند، اختصاصیت بالایی در حدود ۹۰-۸۰٪ برای این سلول ها در بیماری سلیاک در نظر گرفته شده است.(۱۰) در بیماری سلیاک نشان داده شده است که لنفوسیت های T گاما-دلتا قبل از لنفوسیت های T آلفا-بتا و همچنین قبل از بروز آتروفی در روده کوچک افزایش می یابند، و از این نظر دارای حساسیت بالایی در حدود ۸۰-۷۰٪ نیز برای این بیماری است.(۱۱) همچنین پس از درمان نیز برخلاف سلول های T آلفا-بتا که کاهش می یابند، نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا همچنان بالا باقی می ماند. قابل ذکر است که ارتباط مستقیم این سلول ها با ژن های مستعد کننده این بیماری (HLA-DQ2 and DQ8) نیز دیده شده است. هرچند تا کنون نقش لنفوسیت های T گاما-دلتا در خون و بافت ها شناسایی نشده است، لیکن با توجه به این شواهد ذکر شده، محققین نقش های مختلفی مانند نقش پاتولوژیک و یا نقش محافظتی را به سلول های T گاما-دلتا در این بیماری نسبت داده اند.(۱۲)

با در نظر گرفتن این که اکثر تحقیقات انجام شده روی لنفوسیت های T گاما-دلتا در بیماری سلیاک مربوط به روده کوچک است، و با توجه به این که این سلول ها در خون محیطی نیز حضور دارند، در این مطالعه ما قصد داشتیم، به دلیل اهمیت و ارتباط این سلول ها در این بیماری، میزان آنها را در خون محیطی افراد مبتلا به سلیاک در جهت یافتن یک رابطه معنی دار احتمالی با بیماری سلیاک بررسی نماییم.

روش بررسی:

انتخاب بیماران و نمونه گیری: از بیماران مبتلا به سلیاک (۱۵ نفر) که از تاریخ بهمن ماه سال ۱۳۹۱ تا بهمن ماه سال ۱۳۹۲ تشخیص داده شده بودند در زمان تشخیص بیماری نمونه خون با کسب رضایت نامه گرفته شد و با توجه به سن و جنس آنها از افراد سالم (۲۱ نفر)، که مبتلا به بیماری خاصی نبودند و همچنین از دارو های NSAIDs (حد اقل یک دوز منظم از هر NSAID در هفته طی ۴ هفته گذشته) مصرف نمی کردند، نیز با کسب رضایت نامه نمونه خون تهیه شد. میانگین سن در گروه شاهدان برابر ۱۱/۴ SD ±۳۸ و در گروه بیماران ۱۶/۳ SD ±۳۵/۸ بود، که اختلاف معناداری نداشتند.(p=۰/۶۳) همچنین آزمون Chi-square نشان داد که دو گروه از نظر توزیع جنسیت اختلاف معنا دار نداشتند.(p=۰/۴۷) توزیع جنسیت در دو گروه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: توزیع جنسیت در گروه های بیماران و شاهدان

جنسیت	گروه شاهد ان		گروه بیماران	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مذکر	۸	٪۳۸/۱	۴	٪۲۶/۷
مونث	۱۳	٪۶۱/۹	۱۱	٪۷۳/۳
تعداد کل	۲۱	٪۱۰۰	۱۵	٪۱۰۰

خون حاصل در دو لوله متفاوت از نظر ضد انعقاد گرفته شد. از لوله حاوی Ethylendiamine tetra-acetic acid (EDTA) جهت شمارش سلول های خونی با دستگاه سلول شمار استفاده شد، و از لوله حاوی هپارین (Heparin) جهت آماده سازی نمونه برای فلوسایتومتری استفاده شد.

شمارش قدر مطلق لنفوسیت ها: با استفاده از دستگاه سلول شمار Sysmex تعداد کل لنفوسیت ها در هر میکرولیتر خون به دست آمد.

آنتی بادی ها:

الف) آنتی بادی های مونوکلونال (Monoclonal antibodies) شامل:

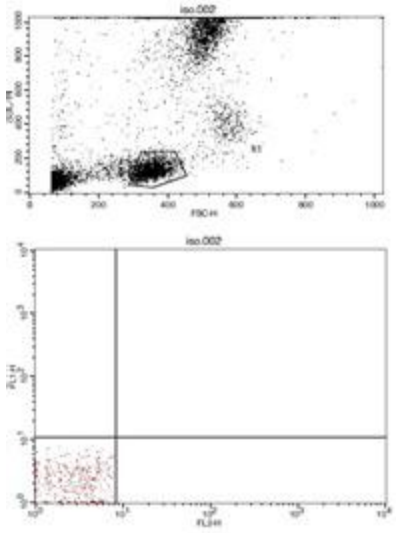
آنتی بادی ضد CD۳ نشاندار شده با PE (Phycoerythrin) (Anti-TCR-γ/δ-1, clone 11F2; Catalog No. 347903; BD);

آنتی بادی مونوکلونال ضد پذیرنده گاما-دلتا نشاندار شده با FITC (Flu orescein isothiocyanate) (Anti-TCR-γ/δ-1, clone 11F2; Catalog No.347903; BD);

ب) آنتی بادی های شاهد (Isotype controls) شامل:

(PE Mouse IgG1, κ Isotype Control; Cat No.556650; BD) و (FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control; Cat No. 556649; BD).

آماده سازی نمونه و فلوسایتومتری: برای هریک از نمونه ها، دو لوله شاهد و آزمون در نظر گرفته شد. در لوله آزمون (test tube) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از خون هپارینه و ۵ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال ضد CD۳ و ۵ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال ضد پذیرنده گاما-دلتا اضافه شد، پس از انکوباسیون به آنها محلول لیز کننده (IQ Lyse; IQP-199; from IQ Products, the Netherlands) جهت حذف گلبول های قرمز اضافه شد و بعد از سانتریفیوژ مایع بالایی دور ریخته شد و به رسوب سلولها بافر فسفات (Phosphate-buffered saline) اضافه گردید. همچنین در لوله شاهد (Isotype control) مراحل فوق با آنتی بادی های ایزوتایپ کنترل انجام شد. سپس با دادن لوله شاهد به دستگاه فلوسایتومتری (FACSCalibur flow cytometer) که به نرم افزار Cell Quest مجهز بود، ابتدا لنفوسیت ها بر اساس پراکنش نوری جداسازی شدند و در مرحله بعد میزان اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی و همچنین فلورسانس داخلی سلولها مشاهده گردید و چارت فلوسایتومتری جهت حذف آنها رسم گردید. سپس لوله آزمون به دستگاه داده شد و درصد سلول های مورد نظر به دست آمد. شکل ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به نمونه های شاهد و آزمون است.



شکل ۱: نمونه ای از لوله شاهد (Isotype control)

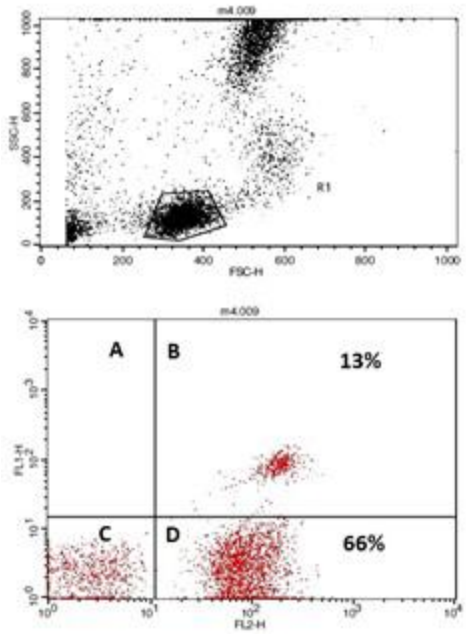
روش تجزیه و تحلیل داده ها: از آزمون تی نمونه های مستقل (Two Independent Samples t Test) جهت مقایسه میانگین نتایج حاصل از گروه های بیماران و شاهد ان استفاده گردید. همچنین همگون بودن دو گروه از نظر جنسیت توسط آزمون Chi-square بررسی گردید. اطلاعات جمع آوری شده توسط نرم افزار آماری SPSS(SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز گردید. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردیدند. ٪۵≥p value معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها:

بین گروه های بیماران و شاهد ان اختلاف معنا داری در میانگین درصد لنفوسیت های T گاما-دلتا به لنفوسیت های T درخون محیطی مشاهده نشد.(p value=۰/۸۴) یافته های حاصل از بیماران و شاهدان در جدول ۲ با یکدیگر مقایسه شده اند. همچنین، در هر دو گروه میزان میانگین این سلول ها در خانم ها به میزان اندکی بالاتر از آقایان بود، که با تفکیک جنسیت نیز اختلاف معنا داری در میانگین این سلول ها بین گروه های بیماران و شاهد ان مشاهده نگردید (مقایسه ها آورده نشده است). همچنین شمارش قدر مطلق لنفوسیت ها بین گروه های بیماران و شاهد ان تفاوت معنا داری نداشت.(p value>۰/۰۵)

بحث:

هدف این مطالعه تعیین میانگین نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا به لنفوسیت های T خون محیطی در بالغین مبتلا به بیماری سلیاک و افراد سالم بود. نتایج این مطالعه نشان دادند که افزایش معنی داری در نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا خون محیطی بین دو گروه مشاهده نشد. این نتایج بر خلاف یافته های حاصل از مطالعات بر روی کودکان مبتلا به سلیاک بود.(۱۳) همچنین نتایج این مطالعه با یافته های مطالعات اخیر که بر روی



شکل ۲: نمونه ای از لوله آزمون (Test tube)

بزرگسالان انجام شده است مطابقت دارد.(۱۹-۱۴) شایان ذکر است که از نظر فنوتیپی لنفوسیت های T گاما-دلتا را به دو زیر گروه اصلی δ۱ و δ۲ تقسیم می کنند. تحقیقات در مورد بیماری سلیاک نشان داده است که آن دسته از لنفوسیت های T گاما-دلتا که در این بیماری افزایش می یابند و دارای اهمیت تشخیصی هستند زیرگروه δ۱ است و زیر گروه δ۲ در این بیماری افزایش نمی یابد.(۲۰) در مطالعات اخیر نشان داده شده است که در دوران نوزادی و قبل از بلوغ، اکثر لنفوسیت های T گاما-دلتا موجود در خون محیطی و سطوح پوششی بدن از نوع δ۱ هستند، و افزایش آنها در خون و روده کوچک اطفال مبتلا به سلیاک را مربوط به همین امر دانسته اند.(۲۱و ۲۲) حال آنکه بعد از بلوغ زیرگروه δ۱ در خون کاهش می یابد و در مقابل زیرگروه δ۲ افزایش می یابد و در نتیجه در بیماران بالغ مبتلا به سلیاک افزایش این سلول ها در خون محیطی مشاهده نمی گردد.(۲۰ و ۲۳)

قابل ذکر است که لنفوسیت های T داخل بافت اپی تلیوم روده کوچک در خون گردش نمی کنند. همچنین در تحقیقات اخیر نشان داده شده است که در خون بیماران مبتلا به سلیاک که درمان نشده اند و در بیمارانی که در فاز درمان با رژیم غذایی عاری از گلوتن هستند GFD (Gluten-free diet)، همانند افراد سالم، سلول هایی با فنوتیپ لنفوسیت های T داخل بافت اپی تلیوم روده کوچک وجود ندارند و نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا در خون محیطی آنها همانند افراد سالم است. با این وجود، اگربه بیمارانی که در فاز درمانی GFD هستند، رژیم غذائی دارای گلوتن داده شود، سلول هایی با فنوتیپ لنفوسیت های T داخل بافت اپی تلیوم روده کوچک جهت فعال شدن و تکثیر در گره های لنفی، به مدت چند روز در

جدول ۲: مقایسه نتایج گروه های بیماران و شاهدان

متغیر	گروه شاهد ان		گروه بیماران		p-value
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
نسبت لنفوسیت های T گاما-دلتا به کل لنفوسیت های T	۱۰/۲	۴/۶	۱۲/۶	۵/۲	۰/۸۴

خون محیطی آنها گردش می کنند و سپس از خون حذف می شوند و در روده کوچک لانه گزینی می کنند.(۱۴)

نتیجه گیری:

در پایان، نتایج حاصل از این مطالعه نشـان داد که میانگین نسـبت لنفوسیت های T گاما-دلتا خون محیطی بالغین در بین گروه های بیماران و شاهد ان اختلاف معنی داری نداشت و جهت تشخیص سودمند نیست و از این لحاظ با سایر مطالعات مطابقت دارد.

سپاسگزاری:

از افرادی که حاضر به شرکت در این مطالعه شدند و همچنین از کارکنان مرکز تحقیقات پور سینا حکیم، انجمن سلیاک و از تمام افرادی که در انجام این طرح ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را به عمل می آوریم.

REFERENCES

1. Di Sabatino A and Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet* 2009; 373:1480-93.
2. Briani C, Samaroo D and Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 2008;7:644-50.
3. Catassi C, Bearzi I, Holmes GK. Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology* 2005;128:S79-86.
4. Not T, Tommasini A, Tonini G, Buratti E, Pocecco M, Tortul C,et al. Undiagnosed coeliac disease and risk of autoimmune disorders in subjects with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:151-5.
5. Sanchez-Albisua I, Wolf J, Neu A, Geiger H, Wäscher I, Stern M. Coeliac disease in children with Type 1 diabetes mellitus: the effect of the gluten-free diet. *Diabet Med* 2005;22:1079-82.
6. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 2006;131:1981-2002.
7. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636-51.
8. Meuer S, Schlossman SF and Reinherz EL. Differential activation and specificity of individual human T cell subpopulations. *Band T Cell Tumors* 2012; 24: 127.
9. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008;73:975-83.
10. Järvinen TT, Kaukinen K, Laurila K, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Mäki M.et al. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1332-7.
11. Chang F, Mahadeva U, Deere H. Pathological and clinical significance of increased intraepithelial lymphocytes (IELs) in small bowel mucosa. *APMIS* 2005;113:385-99.
12. Oberhuber G. Histopathology of celiac disease. *Biomed Pharmacother* 2000;54:368-72.
13. Klemola T, Tarkkanen J, Ormälä T, Saxen H, Savilahti E. Peripheral gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes are increased in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;18:435-9.
14. Han A, Newell EW, Glanville J, Fernandez-Becker N, Khosla C, Chien YH, et al. Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ αβ T cells and γδ T cells in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13073-8.
15. Ráki M, Fallang LE, Brottveit M, Bergseng E, Quarsten H, Lundin KE, et al Tetramer visualization of gut-homing gluten-specific T cells in the peripheral blood of celiac disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2831-6.
16. Kerttula TO, Collin P, Mäki M, Hurme M. Normal T-helper 1/T-helper 2 balance in peripheral blood of coeliac disease patients. *Scand J Immunol* 1999;49:197-202.
17. Di Sabatino A, Bertrandi E, Casadei Maldini M, Pennese F, Proietti F, Corazza GR. Phenotyping of peripheral blood lymphocytes in adult coeliac disease. *Immunology* 1998;95:572-6.
18. Anderson RP, van Heel DA, Tye-Din JA, Barnardo M, Salio M, Jewell DP, et al. T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut* 2005;54:1217-23.
19. Kerttula TO, Hällström O, Mäki M. Phenotypical characterization of peripheral blood T cells in patients with coeliac disease: elevation of antigen-primed CD45RO+ T lymphocytes. *Immunology* 1995;86:104-9.
20. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 2013;13:88-100.
21. Faure F, Jitsukawa S, Triebel F, Hercend T. Characterization of human peripheral lymphocytes expressing the CD3-gamma/delta complex with anti-receptor monoclonal antibodies. *J Immunol* 1988;141:3357-60.
22. De Libero G. Tissue distribution, antigen specificity and effector functions of gamma delta T cells in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 2000;22:219-38.
23. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* 2005;309:264-8.

Original Article

Evaluation of The Mean Percentages of The Peripheral Blood Gamma Delta T Lymphocytes in The Healthy Subjects and Celiac Patients in Isfahan

Ali Abtahi[1], Mohammad-Hassan Emami[2], Fereshteh Alsahebfosoul[1], Mohsen Masjedi[1], Ali Saffaei[3]

[1] Department of Immunology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] Department of Gastroenterology and Hepatology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan.
[3] Pharmacy Students' Research Committee, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical sciences, Isfahan, Iran

ABSTRACT

Background:
An elevation in the mean percentages of the gamma delta T lymphocytes per total T cells in the epithelium of the small intestine has a diagnostic value for celiac disease. This study aimed to measure the percentages of the peripheral blood gamma delta T lymphocytes in the adults' celiac disease and healthy controls.

Materials and Methods:
In this case-control study the absolute numbers of the peripheral blood lymphocytes obtained from the controls (n = 21) and celiac patients (n=15) were studied, Using a cell counter. The proportions of the gamma-delta T lymphocytes were evaluated by the flow cytometer method.

Results:
The results showed that there was not significant I difference in the percentages of the gamma-delta T lymphocytes between celiac patients and healthy individuals.(*p* value= 0.84)

Conclusion:
Collectively, the data show that the percentages of the peripheral blood gamma delta T lymphocytes could not be helpful for celiac disease diagnosis.

Keywords: Celiac disease; T lymphocytes; Peripheral blood

please cite this paper as:
Abtahi A, Emami MH, Alsahebfosoul F, Masjedi M , Saffaei A. Evaluation of The Mean Percentages of The Peripheral Blood Gamma Delta T Lymphocytes in The Healthy Subjects and Celiac Patients in Isfahan. *Govaresh* 2015;20:85-9.

Corresponding author:
Mohsen Masjedi, Ph.D
Department of Immunology, Faculty of Medicine,
Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan,
Iran
Tel: + 98 31 37922416
Fax:+ 98 21 36688597
E-mail: masjedi@med.mui.ac.ir
Received: 09 Feb. 2015
Edited: 04 May 2015
Accepted: 05 May 2015