به دست آوردن محدوده طبیعی برای تعداد لنفوسیتهای میان بافت پوششی در بخش دوم دوازدهه در افراد سالم ایرانی

دکتر سیاوش ناصری مقدم[۱]، دکتر آزاده مفید[۲]، دکتر مسعود ستوده[۱]، دکتر سید مهدی نورایی[۳]، دکتر اکرم پورشمس[۱]، دکتر بهنوش عابدی[۴]، دکتر رضا ملک‌زاده[۵]

[۱] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] استادیار، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۴] پژوهشگر، پاتولوژیست، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف

اثبات ارتشاح بیش از حد لنفوسیتها در بافت پوششی مخاط روده باریک به‌خصوص دوازدهه وژژنوم کلید تشخیص قطعی بیماری سلیاک در نمونه‌های بافت‌شناسی است. هدف ازاین مطالعه به دست آوردن محدوده طبیعی برای تعداد لنفوسیتهای میان بافت پوششی (IEL) مخاط بخش دوم دوازدهه در افراد سالم ایرانی است.

روش بررسی

چهار نمونه بیوپسی از مخاط ظاهراً سالم بخش دوم دوازدهه ۵۰ فرد مراجعه‌کننده به بیمارستان شریعتی (۴۸ نفر با شکایت سوزش سردل، ۲ نفر جهت بررسی واریس مری) که نکته‌ای به نفع سوءجذب و اختلالات روده باریک در شرح حال، معاینه بالینی، آزمایشهای روتین و تست غربالگری سلیاک (سطح آنتی‌بادی ضد ترانس گلوتامیناز بافتی) نداشتند تهیه شد. نمونه‌ها به دو روش هماتوکسیلین-ائوزین (HE) و ایمونوهیستوشیمی (IHC) از نظر مارکر مشترک لوکوسیتی رنگ‌آمیزی شدند. حداقل ۶۰۰-۵۰۰ سلول ازقله و تنه ویلوس‌ها به‌طور جداگانه شمارش و تعداد لنفوسیتها به نسبت ۱۰۰ سلول پوششی بیان شد.

یافته‌ها

میانگین تعداد IEL در ویلوس کامل در رنگ‌آمیزی IHC معادل ۲۱/۱۰۰ (در قله ویلوس‌ها ۲۳/۱۰۰ و در تنه ویلوس‌ها ۲۱/۱۰۰، $p = ۰/۰۵۶$) و در رنگ‌آمیزی HE معادل ۱۹/۱۰۰ (در قله ویلوس‌ها ۱۹/۱۰۰ و در تنه ویلوس‌ها ۱۸/۱۰۰، $p = ۰/۰۳۵$) بود ($p = ۰/۰۰۶$). در ویلوس کامل حداکثر طبیعی تعداد IEL (میانگین +۲ انحراف معیار) در رنگ‌آمیزی IHC ۳۵/۱۰۰ و در رنگ‌آمیزی HE ۳۴/۱۰۰ و با احتساب دامنه اطمینان ۹۵ درصد به ترتیب ۳۹/۱۰۰ و ۳۷/۱۰۰ بود. میانگین نسبت ارتفاع ویلوس به عمق کریپت ۳/۹۴ بود.

نتیجه‌گیری

مقادیر مساوی و کمتر از ۳۵/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی IHC و ۳۴/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی HE طبیعی و به ترتیب مقادیر ۳۹/۱۰۰-۳۵ و ۳۷/۱۰۰-۳۴ مشکوک و بالاتر از ۳۹/۱۰۰ و ۳۷/۱۰۰ بیمارگونه خواهد بود. گرچه نتایج در دو روش رنگ‌آمیزی تفاوت معناداری داشتند ولی با توجه به صرفه اقتصادی روش رنگ‌آمیزی HE جهت کارهای معمول بالینی توصیه می‌شود.

کلید واژه: لنفوسیت، بافت پوششی، دوازدهه، لنفوسیت‌های میان بافت پوششی

گوارش/ دوره ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵، ۸۶-۹۲

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۲/۲۱ **تاریخ اصلاح نهایی:** ۸۵/۶/۱ **تاریخ پذیرش:** ۸۵/۶/۴

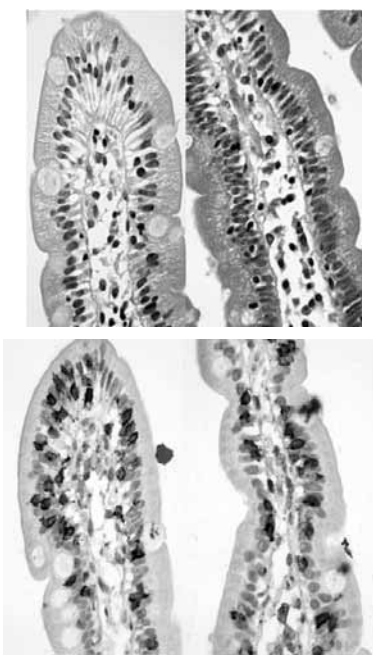
زمینه و هدف

به‌طور طبیعی تعدادی لنفوسیت در لایه پوششی مخاط روده باریک وجود دارند که به آنها لنفوسیت‌های اینتراپیتلیال (IEL) می‌گویند.(۴)، افزایش ارتشاح آنها در لایه پوششی که لنفوسیتوز خوانده می‌شود در نتیجه برخی واکنشهای ایمنی مانند بیماری سلیاک(۱)، تروپیکال اسپرو(۱)، لنفوم سلول T همراه انتروپاتی(۱)، میکرواسپرودیازیس(۵) و انتروپاتی همراه با حساسیت غذایی در کودکان رخ می‌دهد.(۱)

تشخیص بیماری سلیاک به‌عنوان بیماری‌ای که بسیار شایع است و کیفیت زندگی را تحت تأثیر قرار می‌دهد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. افزایش تعداد لنفوسیتهای اینتراپیتلیال از اولین تغییرات پاتولوژیک است که در جریان حساسیت به گلوتن رخ می‌دهد. مشاهده

نویسنده مسئول: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، کدپستی ۱۴۱۱۴
تلفن و نمابر: ۸۸۰۱۲۹۹۲
E-mail: sianm@ams.ac.ir

ارتشاح لنفوسیتی در مخاط بخش دوم دوازدهه و ژژنوم کلید تشخیصی بیماری سلیاک به‌خصوص در مراحل اولیه است.(۱)، تعداد طبیعی لنفوسیتها در بافت پوششی مخاط دوازدهه و ژژنوم در نقاط مختلف دنیا و در نژادهای گوناگون می‌تواند متفاوت باشد.(۱)، همچنین تحقیقاتی که به تعداد طبیعی IEL پرداخته باشند اندکند و نتایج متفاوتی داشته‌اند. بنابراین افتراق میان تعداد طبیعی لنفوسیتها در لایه پوششی و لنفوسیتوز دقیق نمی‌باشد. در آخرین تحقیق انجام شده در این زمینه، وِرس ★ و همکارانش در سوئد، تعداد حداکثر ۲۰ لنفوسیت در میان صد سلول پوششی از مخاط دوازدهه در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و ۲۵ لنفوسیت در میان ۱۰۰ سلول پوششی از مخاط دوازدهه در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی را به‌عنوان حداکثر تعداد طبیعی IEL گزارش نمودند.(۲)، قبل از آن عدد ۴۰ لنفوسیت در ۱۰۰ سلول پوششی روده به‌عنوان حداکثر مقدار طبیعی شناخته می‌شد و حدود ۳۰ سال مورد استناد قرار می‌گرفت.(۳)، در این بررسی ما از دو روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و هماتوکسیلین-ائوزین استفاده کردیم تا محدوده دقیقی از تعداد طبیعی لنفوسیتها در میان بافت پوششی دوازدهه افراد سالم ایرانی به دست آوردیم (شکل ۱).



الف

ب

شکل ۱: الف-قله و تنه ویلوس در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، ب- قله و تنه ویلوس در رنگ‌آمیزی ایمونو هیستو شیمی

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آینده‌نگر (گزارش موارد)، مخاط بخش دوم دوازدهه در ۵۰ نفر (۲۷ زن و ۲۳ مرد) که در روزهای شنبه و دوشنبه بعدازظهر به‌طور متوالی از اول آبان ماه سال ۱۳۸۳ تا اول اردیبهشت ۱۳۸۴ به بیمارستان شریعتی جهت انجام آندوسکوپی مراجعه کرده بودند و معیارهای ورود به مطالعه (جدول ۱) را داشتند مورد بررسی قرار گرفت. پس از تکمیل رضایت‌نامه، شرح حال کاملی با توجه خاص به علائم بیماریهای روده کوچک و سوءجذب از هر فرد تهیه می‌شد. چنانچه در شرح حال نکته مثبتی به نفع موارد مذکور یافت نمی‌شد، معاینه بالینی کاملی جهت رد هرگونه علائم و نشانه‌ای از سوءجذب و اختلال روده باریک صورت می‌گرفت. شمارش کامل گلبول‌های خونی، آهن سرم، TIBC، فریتین، آلبومین سرم، کلسیم، فسفر، تری‌گلیسیرید، کلسترول و آزمایش مدفوع از نظر انگل و خون مخفی در هر فرد انجام می‌شد. سپس از هر بیمار ۵ سی‌سی خون گرفته می‌شد که پس از جداکردن سرم آنها در فریزر در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد و همه آنها در یک مرحله از نظر آنتی‌بادی از نوع ایمونوگلبولین A علیه ترانس‌گلوتامیناز بافتی (Anti tissue transglutaminase, t-TG) مورد بررسی قرار می‌گرفتند. در صورت وجود کم‌خونی، کمبود آهن یا سایر علائم مشکوک به سوءجذب، فرد از مطالعه کنار گذاشته می‌شد. در مرحله بعد با انجام آندوسکوپی مخاط از لحاظ ظاهری مورد بررسی دقیق قرار می‌گرفت و هرگونه نکته غیرطبیعی مثل مضرس‌شدن چینها، کم‌شدن چینها، زخم، خراشیدگی یا تغییر شکل گزارش می‌شد. از هر فرد حین انجام آندوسکوپی ۴ نمونه بیوپسی از بخش دوم دوازدهه تهیه می‌گردید و بلافاصله روی کاغذهای صافی مخصوصی جهت‌دهی (orient) می‌شد. نمونه‌ها پس از تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد در پارافین قالب‌گیری می‌گردید و برشهایی به ضخامت ۴ میکرومتر از آنها تهیه می‌شد و لام‌های حاصل به دو روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی می‌شدند. جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برشها روی لام‌های آغشته به ماده پلی‌ال-لایزین (poly L-lysine) قرار می‌گرفت و با آنتی‌بادیهای مونو کلونال نشاندار مخصوص علیه آنتی‌ژن مشترک لوکوسیتی (LCA, leukocyte common Ag) رنگ‌آمیزی شد. زمینه این لامها با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردید. پاتولوژیست ابتدا نمونه‌های رنگ شده به روش هماتوکسیلین ائوزین را بررسی می‌نمود و در صورت مشاهده آتروفی، ارتشاح سایر لوکوسیت‌ها و هرگونه تغییر غیرعادی

جدول ۱: معیارهای ورود افراد به مطالعه

مبتلا به سوءجذب یا هرگونه اختلال روده باریک نباشند.
آندوسکوپی آنها به علتی به جز این اختلالات باشد.
حداقل ۱۶ سال داشته باشند.
جهت ورود به مطالعه رضایتنامه مربوط را مطالعه و امضا کرده باشند.

★ Veress

ساختار غددی و شکل ظاهری، آن نمونه‌ها را از مطالعه خارج می‌نمود. حذف این نمونه‌ها به این دلیل بود که سایر لوکوسیت‌ها نیز به همراه لنفوسیتها با مارکر ضد آنتی‌ژن مشترک لوکوسیتی رنگ می‌گیرند و سبب بروز خطا در شمارش تعداد طبیعی لنفوسیتها در لایه پوششی می‌گردند. ارتباط ویلوس‌ها و عمق کریپت‌ها توسط ابزار چشمی خاصی (graded ocular lens) اندازه‌گیری شدند و نسبت آنها محاسبه شد. سپس تعداد لنفوسیتهای میان بافت پوششی (IEL) در نمونه‌های رنگ شده به روش ایمونوهیستوشیمی و بدون آگاهی از نتایج همان نمونه در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین شمرده می‌شد و جهت پرهیز از خطا، شمارش در نقاط مجاور استروما که ارتشاح لنفوسیتی در آنها مشهود بود انجام نمی‌گرفت. هسته‌های فشرده و مثلثی شکل سلولهای گابلت به دقت از لنفوسیت‌ها افتراق داده می‌شد و فقط لنفوسیتهایی که در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین دارای سیتوپلاسم بودند شمارش شدند. در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی هم حلقه‌هایی که کاملاً رنگ گرفته بودند به‌عنوان هسته لنفوسیتها منظور شدند و گرانول‌های قهوه‌ای در میان لایه‌های پوششی مورد نظر قرار نگرفتند. فقط لنفوسیتهای بالای غشاء پایه به‌عنوان لنفوسیتهای میان بافت پوششی منظور می‌گردید. ۶۰۰-۵۰۰ سلول از تنه ویلوس‌ها و ۶۰۰-۵۰۰ سلول از قله ویلوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت. فقط ویلوس‌هایی که بسیار خوب جهت‌دهی (orient) شده بودند و توالی سالم و دست نخورده‌ای از بافت پوششی داشتند مورد شمارش قرار می‌گرفتند. بنابراین حداقل ۱۲۰۰-۱۰۰۰ سلول از چند ویلوس سالم شمارش می‌شدند و تعداد IEL به‌صورت کسری نسبت به ۱۰۰ سلول پوششی بیان می‌شد. این نسبت در قله ویلوس‌ها، تنه ویلوس‌ها و کل ویلوس‌ها به‌طور جداگانه محاسبه شد تا امکان مقایسه نتایج در نقاط مختلف ویلوس و روشهای مختلف رنگ‌آمیزی میسر شود. نسبت ارتفاع ویلوس‌ها به عمق کریپت‌ها به‌صورت نیمه کمّی در نمونه‌های رنگ شده به هر دو روش به‌طور جداگانه محاسبه شد.

روشهای آماری

ما نتایج را در ۶ گروه به شرح زیر مورد بررسی قرار دادیم: تعداد IEL در قله ویلوس‌ها در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، تعداد IEL در تنه ویلوس‌ها در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، تعداد IEL در کل ویلوس‌ها در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، تعداد IEL در قله ویلوس‌ها در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، تعداد IEL در تنه ویلوس‌ها در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و تعداد IEL در کل ویلوس‌های در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین. میانگین، میانه، حداکثر، حداقل و انحراف معیار و مقادیر interquartile rate برای هر گروه از داده‌ها محاسبه شد. فرض طبیعی بودن با استفاده ازتست Kolmogrov-Smirnov One sample برای هر گروه از داده‌ها بررسی شد. محدوده طبیعی تعداد IEL بر اساس mean±2SD محاسبه شد و با محاسبه ۹۵ درصد دامنه اطمینان بیان شد. دامنه اطمینان ۹۹ درصد هم برای میانگین به اضافه و منهای سه انحراف معیار محاسبه گردید.

مدل رگرسیون لیست پروداکت (least product regression) جهت برآورد میزان خطای ثابت و تصادفی (fixed and random error) هنگام مقایسه دو روش رنگ‌آمیزی به کار گرفته شد. برای متغیرهای کمّی این روش آنالیز بهترین روش جهت بررسی همخوانی نتایج می‌باشد.

تحلیل آماری با استفاده از برنامه آماری (SPSS version 12.5, SPSS incorp., Chicago, IL) انجام گرفت.(۷)

یافته‌ها

۵۰ نفر (۲۷ زن و ۲۳ مرد) مورد بررسی قرار گرفتند. شکایت اصلی که منجر به انجام آندوسکوپی شده بود در ۴۸ نفر بیماری ریفلاکس معده به مری و در ۲ نفر بررسی واریسهای مری بود. میانه سنی افراد ۴۰ سال بود (محدوده سنی ۵۳-۱۷ سال). نتایج و داده‌ها در ۴۶ فرد در هر دو روش رنگ‌آمیزی مورد اطمینان بود.

در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، میانگین تعداد IEL در قله ویلوس‌ها ۱۹ (حداقل ۷ و حداکثر ۳۸)، در تنه ویلوس‌ها ۱۸ (حداقل ۵ و حداکثر ۳۸) و در کل ویلوس‌ها ۱۹ (حداقل ۶ و حداکثر ۳۸) بوده است (جدول ۲).

در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، میانگین تعداد IEL در قله ویلوس‌ها ۲۳ (حداقل ۹ و حداکثر ۵۲)، در تنه ویلوس‌ها ۲۱ (حداقل ۸ و حداکثر ۳۴) و در کل ویلوس‌ها ۲۱ (حداقل ۹ و حداکثر ۳۸) بوده است (جدول ۲).

حداکثر تعداد طبیعی IEL (mean±2SD) نسبت به ۱۰۰ سلول پوششی، در رنگ‌آمیزی هما توکسیلسن-ائوزین به ترتیب در قله

جدول ۲: نتایج حاصل از شمارش لنفوسیت‌ها در میان ۱۰۰ سلول پوششی در نقاط مختلف ویلوس‌ها و روشهای مختلف رنگ‌آمیزی

	لنفوسیت‌های میان اپیتلیوم	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
هماتوکسیلین -ائوزین	قله	۱۹	۷/۷	۷	۳۸
	تنه	۱۸	۷/۸	۵	۳۸
	کل ویلوس	۱۹	۷/۵	۶	۳۸
ایمونوهیستوشیمی	قله	۲۳	۹/۰	۹	۵۲
	تنه	۲۱	۶/۸	۸	۳۴
	کل ویلوس	۲۱	۶/۹	۹	۳۸

ویلوس ۳۴ (محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۳۸-۳۰)، در تنه ویلوس ۳۴ (محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۳۸-۲۹) و در کل ویلوس‌ها ۳۴ (محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۳۷-۲۹) بوده است (جدول ۳).

حداکثر تعداد طبیعی IEL (mean±2SD) نسبت به ۱۰۰ سلول پوششی در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی به ترتیب در قله ویلوس ۴۱ (محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۴۵-۳۵)، در تنه ویلوس ۳۴ (محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۳۸-۳۰) و در کل ویلوس‌ها ۳۵ (محدوده اطمینان ۹۵ درصد ۳۹-۳۱) بوده است (جدول ۳). مقادیر محاسبه شده برای حداکثر تعداد طبیعی IEL با محدوده اطمینان ۹۹ درصد نیز در جدول ۳ آورده شده است.

با توجه به نتایج به دست آمده، مقادیر کمتر و مساوی حداکثر محاسبه شده برای تعداد IEL طبیعی فرض می‌گردد. مقادیری که بیش از حداکثر طبیعی تعداد IEL هستند، ولی در محدوده اطمینان ۹۵ درصد قرار دارند، مشکوک به افزایش IEL هستند و مقادیری که بالاتر از محدوده اطمینان ۹۵ درصد هستند، قطعاً افزایش غیرطبیعی در تعداد IEL دارند.

بنابراین در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، در قله ویلوس‌ها مقادیر مساوی و کمتر از ۳۴ طبیعی، ۳۸-۳۵ مشکوک و مقادیر بالاتر از ۳۸ غیرطبیعی خواهند بود. در تنه ویلوس‌ها مقادیر مساوی و کمتر از ۳۴ طبیعی، ۳۸-۳۵ مشکوک و بالاتر از ۳۸ غیرطبیعی خواهد بود.

در کل ویلوس‌ها مقادیر مساوی و کمتر از ۳۴ طبیعی، ۳۷-۳۵ مشکوک و بالاتر از ۳۷ غیرطبیعی خواهد بود (جدول ۴).

جدول ۳: حداکثر طبیعی تعداد IEL در میان ۱۰۰ سلول پوششی با احتساب ۹۵ و ۹۹ درصد اطمینان در نقاط مختلف ویلوس‌ها و روشهای مختلف رنگ‌آمیزی

		حداکثر طبیعی تعداد IEL (میانگین+۲ انحراف معیار)	محدوده اطمینان ۹۵ درصد	حداکثر طبیعی تعداد IEL (میانگین+۳ انحراف معیار)	محدوده اطمینان ۹۹ درصد
هماتوکسیلین-ائوزین	قله	۳۴	۳۸-۳۰	۴۲	۴۷-۳۶
	تنه	۳۴	۳۸-۲۹	۴۲	۴۲-۳۵
	کل ویلوس	۳۴	۳۷-۲۹	۴۱	۴۶-۳۵
ایمونوهیستوشیمی	قله	۴۱	۴۵-۳۵	۵۰	۵۶-۴۳
	تنه	۳۴	۳۸-۳۰	۴۱	۴۳-۳۵
	کل ویلوس	۳۵	۳۹-۳۱	۴۲	۴۷-۳۷

در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، در قله ویلوس‌ها مقادیر مساوی و کمتر از ۴۱ طبیعی، ۴۵-۴۲ مشکوک و مقادیر بالاتر از ۴۵ غیرطبیعی خواهند بود. در تنه ویلوس‌ها مقادیر مساوی و کمتر از ۳۴ طبیعی، ۳۸-۳۵ مشکوک و بالاتر از ۳۸ غیرطبیعی خواهد بود. در کل ویلوس‌ها مقادیر مساوی و کمتر از ۳۵ طبیعی، ۳۹-۳۶ مشکوک و بالاتر از ۳۹ غیرطبیعی خواهد بود (جدول ۴).

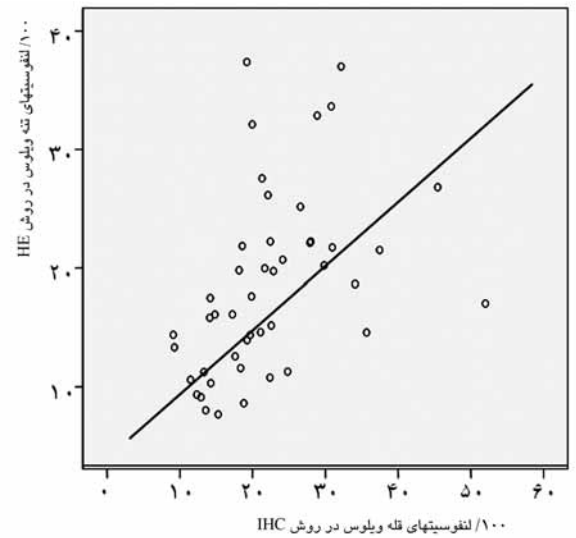
جدول۴: مقادیر پیشنهادی جهت محدوده طبیعی، محدوده مشکوک و محدوده پاتولوژیک در هر نقطه از ویلوس و در هر روش رنگ‌آمیزی با احتساب اطمینان ۹۵ درصد (واحد کلیه اعداد، تعداد لنفوسیتها به ازای ۱۰۰ سلول پوششی می‌باشد)

	لنفوسیت‌های میان بافت پوششی	حداکثر طبیعی	محدوده مشکوک	محدوده غیر طبیعی
هماتوکسیلین-ائوزین	قله	≤۳۴	۳۸-۳۵	<۳۸
	تنه	≤۳۴	۳۸-۳۵	<۳۸
	کل ویلوس	≤۳۴	۳۷-۳۵	<۳۷
ایمونوهیستوشیمی	قله	≤۴۱	۴۵-۴۲	<۴۵
	تنه	≤۳۴	۳۸-۳۵	<۳۸
	کل ویلوس	≤۳۵	۳۹-۳۶	<۳۹

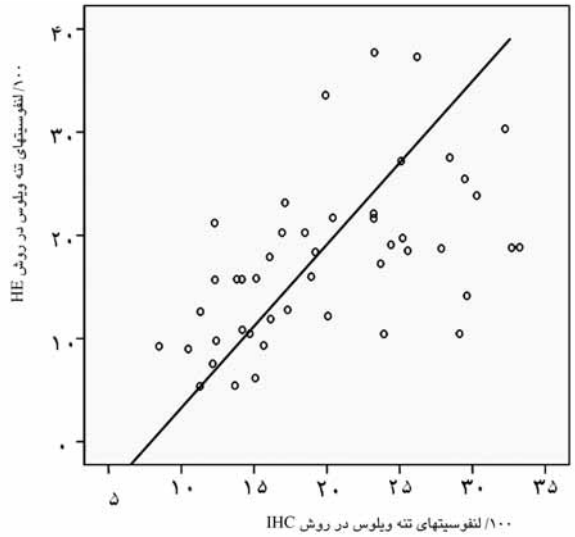
تعداد IEL در دو روش رنگ‌آمیزی در کل ویلوس با هم متفاوت بود ($p = ۰/۰۰۶$). همچنین در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، تعداد IEL در قله ویلوس‌ها با تعداد آنها در تنه ویلوس‌ها متفاوت بود ($p=۰/۰۳۵$). تعداد IEL در تنه و قله ویلوس در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نیز با هم تفاوت داشتند اما این اختلاف از نظر آماری معنادار نبود ($p = ۰/۰۵۶$).

هنگامی که با استفاده از روش آماری least product همبستگی نتایج را در دو روش رنگ‌آمیزی مقایسه کردیم، در قله ویلوس‌ها میزان خطای ثابت ($\alpha = -۰/۵۹$) و میزان خطای نسبی ($\beta = ۰/۸۹$) اندک بود و زاویه خط رگرسیون (۴۱ درجه) همبستگی قابل قبولی میان شمارش تعداد IEL با دو روش رنگ‌آمیزی نشان می‌داد. در تنه ویلوس‌ها نیز میزان خطای ثابت ($\alpha = -۴/۸۶$) و میزان خطای نسبی ($\beta = ۱/۱۱$) قابل قبول بود و زاویه خط رگرسیون (۴۸ درجه) همبستگی بالای میان نتایج را نشان می‌داد. در کل ویلوس‌ها هم میزان خطای ثابت ($\alpha = -۴/۴۱$) و میزان خطای نسبی ($\beta = ۱/۰۷$) قابل قبول بود و زاویه خط رگرسیون (۴۷ درجه) همبستگی بسیار بالای میان نتایج را نشان می‌داد.

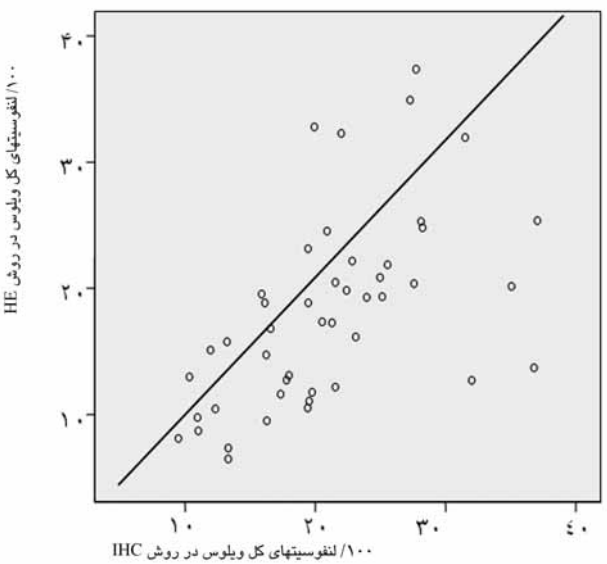
میانگین نسبت ارتفاع ویلوس به عمق کریپت‌ها ۳/۹۴ با انحراف معیار ۰/۸۱، حداقل ۲/۰۰ و حداکثر ۵/۳ بود.



نمودار ۱: همبستگی بین یافته‌ها در دو روش رنگ‌آمیزی (H&E, IHC) در قله ویلوس



نمودار ۲: همبستگی بین یافته‌ها در دو روش رنگ‌آمیزی (H&E, IHC) در تنه ویلوس



نمودار ۳: همبستگی بین یافته‌ها در دو روش رنگ‌آمیزی (H&E, IHC) در کل ویلوس

بحث

اهمیت تشخیص بیماری سلیاک و اینکه تشخیص بافت‌شناختی این بیماری در مراحل اولیه وابسته به مشاهده افزایش ارتشاح لنفوسیتی میان بافت پوششی مخاط دوازدهه و ژژنوم است، تعیین محدوده طبیعی برای تعداد لنفوسیتهای میان بافت پوششی (IEL) را ضروری می‌سازد.(۱)

با توجه به اینکه این محدوده در مناطق مختلف جغرافیایی و نژادهای گوناگون می‌تواند متفاوت باشد(۱) و مطالعاتی که محدوده طبیعی تعداد IEL را بررسی کرده باشند اندکند و نتایج متفاوتی ارائه داده‌اند، بر آن شدیم با محاسبه این محدوده در افراد سالم ایرانی مبنایی جهت تشخیص بموقع این بیماری که می‌تواند با طیف وسیعی از علائم خود را نشان دهد به‌دست آوریم و راه را برای تشخیص بموقع و پیشگیری از عوارض آن هموار نماییم.

در مطالعه‌ای که فرگوسن و موری در سال ۱۹۷۰ انجام دادند، از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین استفاده کردند و تعداد IEL را در برشهای ۷-۵ میکرومتری از نمونه‌های ژژنوم افراد سالم شمارش نمودند. آنها حداکثر تعداد طبیعی IEL را (میانگین به اضافه و منهای دو انحراف معیار) ۴۰ عدد در میان صد سلول پوششی به‌دست آوردند.(۳)، بتمن و همکارانش در سال ۱۹۸۶ با هدف تعیین ارتباط میان انتروپاتی و آلودگی با ویروس نقص ایمنی انسانی، شمارش IEL را در گروه کنترل ده نفری خود که فاقد عامل خطرساز ابتلا به HIV بودند و بررسی میکروسکوپیک و کشت مدفوع آنها از لحاظ انترو پاتی و هرگونه آلودگی پاتولوژیک میکروبی منفی بود انجام دادند. آنها از روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با مارکر مشترک لوکوسیتی (CD45) استفاده کردند و تعداد ۲۰/۵ سلول لنفوسیتی در میان ۱۰۰ سلول پوششی ژژنوم را به‌عنوان حداکثر تعداد طبیعی آنها در بافت پوششی پیشنهاد کردند.(۸)، در سال ۱۹۹۶ اسنیجر و همکارانش تعداد لنفوسیتهای موجود در مخاط دوازدهه افراد آلوده به ویروس HIV و ۱۵ نفر کنترل را بررسی نمودند. آنها از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و مارکر CD-3 جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌های خود استفاده کردند و در هر میدان میکروسکوپی با درشت‌نمایی بالا فقط ۵ سلول لنفوسیتی شمارش کردند، ولی محدوده طبیعی برای لنفوسیتهای میان بافت پوششی را محاسبه نکردند.(۹)، در سال ۲۰۰۱ گلداشتاین و همکارانش در

بررسی بافت‌شناسی مخاط دوازدهه در گروه کنترل ۲۴ نفره خود (شامل ۱۸ زن با میانگین سنی ۳۴/۵ سال) که با شکایت ریفلاکس معده به مری مورد آندوسکوپی قرار می‌گرفتند و فاقد شواهد گاستریت در آنتروم بودند، شمارش را در میان ۲۰ سلول پوششی از ۵ قله ویلوس که به‌طور تصادفی انتخاب شده بودند انجام دادند و میانگین ۲/۲ (۵/۴- ۰/۸) با انحراف معیار ۱/۲ را جهت تعداد طبیعی IEL در میان ۲۰ سلول پوششی مطرح نمودند. آنها از رنگ‌آمیزی H&E جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌های خود استفاده کردند.(۱۰)، در سال ۲۰۰۲، حیات و همکاران محدوده طبیعی تعداد لنفوسیتهای میان بافت پوششی مخاط دوازدهه را در ۲۰ فرد سالم (۱۳ زن با میانه سنی ۳۴ سال) که فاقد شواهد بالینی سوءجذب و دارای تست ترشح قند طبیعی بودند محاسبه کردند. آنها از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و برشهای ۴ میکرومتری استفاده نمودند و بیش از پانصد سلول پوششی و لنفوسیتی را در توالی سالم و دست نخورده‌ای از بافت پوششی مخاط شمارش کردند. آنها همچنین نسبت ارتفاع ویلوس به عمق کریپت را نیز محاسبه کردند. محدوده تعداد لنفوسیتهای میان بافت پوششی در محاسبات آنها ۲۶-۱/۸ سلول در میان ۱۰۰ سلول پوششی با میانگین ۱۱ و انحراف معیار ۶/۸ بود. آنها با فرمول میانگین به اضافه دو انحراف معیار (mean±2SD) حداکثر طبیعی تعداد لنفوسیتها را ۲۵ عدد در میان ۱۰۰ سلول پوششی و میانگین نسبت ارتفاع ویلوس به عمق کریپت را ۱/۸۲ به دست آوردند.(۱۱)، آخرین مطالعه در سال ۲۰۰۴ توسط ورس و همکارانش با هدف شمارش مجدد تعداد لنفوسیتها در میان بافت پوششی انجام شد. آنها ۱۸ فرد سالم و ۵۶ فرد را که با شکایات مختلفی جهت انجام آندوسکوپی مراجعه کرده بودند، مورد مطالعه قرار دادند. از هر کدام از افراد سه نمونه بیوپسی از بخش دوم دوازدهه تهیه شد و نمونه‌های برش داده شده به ضخامت ۳ میکرومتر به دو روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و ایمونوهیستوشیمی از نظر مارکر CD3، رنگ‌آمیزی شدند. لنفوسیتها از میان حداقل ۳۰۰ سلول پوششی در توالی سالم و دست نخورده‌ای از چند ویلوس که به خوبی جهت‌دهی (orient) شده بودند شمارش شدند. حداکثر محدوده طبیعی تعداد لنفوسیتهای +CD3، در میان ۱۰۰ سلول پوششی ۲۵ عدد بود. مقادیر ۲۹-۲۵ سلول لنفوسیتی در میان ۱۰۰ سلول پوششی به‌عنوان مشکوک و مقادیر ۳۰ یا بیشتر به‌عنوان پاتولوژیک مطرح شدند.(۲)

در این مطالعه شمارش تعداد IEL در پنجاه فرد سالم انجام شد. برشهای ۴ میکرومتری مقطع مناسبی جهت شمارش IEL فراهم می‌آورد و در مقایسه با سایر مطالعات (۲، ۳، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱) ضخامت مناسبی می‌باشد. ما شمارش را در میان ۶۰۰-۵۰۰ سلول از تنه و ۶۰۰-۵۰۰ سلول از قله ویلوس‌هایی که ساختار طبیعی مخاطی داشتند انجام دادیم که در کل ۱۲۰۰-۱۰۰۰ سلول از کل ویلوس را شامل می‌شود که نسبت به سایر مطالعات (۲، ۳، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱) از دقت بالاتری برخوردار است. استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی [H&E ,IHC(CD45)] این امکان را فراهم کرد که مقایسه‌ای میان نتایج این دو روش رنگ‌آمیزی انجام دهیم. هنگام مقایسه نتایج این مطالعه با کارهای گذشته مشخص می‌شود که حداکثر محاسبه شده برای تعداد لنفوسیت‌های میان بافت پوششی (mean+2SD) در ویلوس‌های کامل در روش هماتوکسیلین-ائوزین (۳۴/۱۰۰) کمتر از نتایج فرگوسن (۳۶,۱۰/۱۰۰) و بیشتر از ورس (۱۸,۵/۱۰۰) و حیات (۲۵/۱۰۰) بوده است که احتمالاً به خاطر تفاوتهای منطقه‌ای و نژادی در جمعیتهای مورد مطالعه بوده است.

حداکثر محاسبه شده برای تعداد لنفوسیت‌های میان بافت پوششی (mean+2SD) در ویلوس‌های کامل در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (۳۵/۱۰۰) بالاتر از نتایج ورس (۲۵/۱۰۰) و بتمن (۲۰,۵/۱۰۰) بوده است. حداکثر محدوده طبیعی برای لنفوسیت‌های میان بافت پوششی (mean+2CD) در قله ویلوس‌های رنگ شده به روش هماتوکسیلین-ائوزین (۳۴/۱۰۰) بالاتر از نتایج گلد اشتاین (۱۲/۱۰۰) بوده است.

براساس یافته‌های ما، تفاوت معناداری میان نتایج حاصل از دو روش رنگ‌آمیزی وجود داشت مانند آنچه ورس و همکاران گزارش کردند؛ ولی این تفاوت در نتایج ما (۳۴/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در مقابل ۳۵/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی) کمتر از ورس و همکاران است (۱۸,۵/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در مقابل ۲۵/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی). میانگین نسبت ارتفاع ویلوس به عمق کریپت در افراد سالم در این مطالعه مساوی ۳/۹۴ بود که بالاتر از نتایج حیات (۱/۸ = میانگین) می‌باشد.

نتیجه‌گیری

مقادیر محاسبه شده در افراد سالم ایرانی می‌تواند به‌عنوان مبنای مقادیر طبیعی جهت تشخیص راحت‌تر و دقیق‌تر اختلالات روده باریک در نمونه‌های بیوپسی قرار گیرد. مقادیر مساوی و کمتر از ۳۵/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی IHC و ۳۴/۱۰۰ در رنگ‌آمیزی HE طبیعی و به ترتیب مقادیر ۳۹/۱۰۰-۳۵ و ۳۷/۱۰۰-۳۴ مشکوک و بالاتر از ۳۹/۱۰۰ و ۳۷/۱۰۰ بیمارگونه خواهد بود.

گرچه نتایج حاصل از دو روش رنگ‌آمیزی تفاوت معناداری داشتند ولی با توجه به صرفه اقتصادی، روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین جهت کارهای معمول بالینی توصیه می‌شود. پیشنهاد می‌شود میزان خطای فرد آزمایشگر (اینترا و اینترآبزرور) در این دو روش رنگ‌آمیزی محاسبه شود.

تشکر و تقدیر

با تشکر از سرکار خانم پرسا و جناب آقای بوذری که زحمت آماده‌سازی نمونه‌های خونی و بافتی را متقبل شدند.

کلیه هزینه‌های این تحقیق توسط مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد (DDRC)، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران تأمین شده است.

References

1- Rostom A, Dube C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, *et al.* Celiac disease. *Evid Rep Technol Assess* (Summ) 2004; 104: 1-6

2- Verres B, Framen L, Bodin L, Borch K. Duodenal intraepithelial lymphocyte count revisited. *Scand J Gastroenterology* 2004; 39:138-44.

3- Ferguson A, Murry D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut* 1971; 12:988-94.

4- Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 561-91.

5- Dobbins WO. III, Weinstein WM. Electron microscopy of the intestine and rectum in acquired immune - deficiency syndrome. *Gastroenterology* 1985; 88:738-49.

6- Bland M. Clinical measurement. In: Bland M, editor. An introduction to medical statistics. 3rd ed. *Oxford: Oxford University Press;* 1987. p. 280-5.

7- John M. Comparing methods of measurement. Clinical and experimental pharmacology and physiology 1997; 24: 193-203.

8- Batman PA, Miller AR, Foster SM, Harris JR, Pinchinh AJ, Griffin GE. Jejunal Enteropathy associated with human immunodeficiency virus infection: quantitative histology. *J clin pathol* 1989; 42: 275-81.

9- Snijders F, Meenan J, Van den Blink, Van Deventer SJH, Ten kate FJW. Duodenal intraepithelial and lamina propria T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected patients with and with out Diarrhoea. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 1176-81.

10- Gold stein NS, Under hill J. Morphologic features suggestive of gluten sensitivity in architecturally normal duodenal biopsy specimens. *American Journal of clinical pathology* 2001; 116: 63-71.

11- Hayat M, Cairns A, Dixon MF, O' Mahony S. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *J clin pathol* 2002; 55: 393-5.

Nasseri-Moghaddam S
Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Mofid A
Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Sotoudeh M
Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Nouraie M
Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Pourshams A
Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Abedi B
Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Malekzadeh R
Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

Corresponding Author:
Siavosh Nasseri-Moghaddam M.D., Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital, Kargar Ave., P.O.Box: 14114, Tehran, Iran.
Telefax: +98 21 88012992
E-mail: sianm@ams.ac.ir

Determination of the Normal Range of the Number of Intraepithelial Lymphocytes in the Duodenal Mucosa of Healthy Iranian Individuals

ABSTRACT

Background: An increase in the number of intraepithelial lymphocytes (IEL) in the duodenal mucosa is an important criterion for the histological diagnosis of celiac disease (CD). We determined the normal range for intraepithelial lymphocytes (IEL) in the second part of duodenum in healthy Iranian population.

Materials and Methods: Four biopsy samples of the endoscopically normal appearing mucosa at the second part of duodenum were obtained from 50 individuals referred to Shariati hospitals (48 for epigastric pain , 2 for esophageal varices). They had no sign, symptoms and evidence for malabsorption or small intestinal disorders in history, physical examination, Laboratory tests and IgA anti tissue transglutaminase (t.T.G). Four-micrometer thick sections were stained with Hematoxillin-eosine (H&E) and immunohistochemistry (IHC) for leukocyte common antigen (LCA). At least 500-600 cells from the tip and body of villi were counted separately and the number of IEL was given as mean/ 100 epithelial cells.

Results: The mean for IEL count in total villi in IHC method was 21/100 (23/100 in tip, 21/100 in body, p = 0.058) and 19/100 in H&E method (19/100 in tip, 18/100 in body, p =0.035) (p = 0.006). Considering total villi, the normal upper limit (Mean+2SD) was calculated to be 35/100 in IHC and 34/100 in H&E stained sections and normal upper limit of confidence interval (the 95 percentile) was 39/100 in IHC and 37/100 in H&E stained sections. The villus height to crypt depth ratio was 3/94 in average.

Conclusion: Respectively in IHC and H&E methods, the amounts equal or less than 35/100 and 34/100 are considered as normal., values between 35-39/100 and 34-37/100 as border line and counts more than 39/100 and 37/100 represent a pathology. Although the difference between two staining methods was statistically significant, considering cost effectiveness, we recommend H&E staining for routine clinical practice. *Govaresh/* Vol. 11, No. 2, Summer 2006; 86-92

Keywords: Lymphocyte, Epithelium, Duodenum, Intraepithelial Lymphocytes