ORIGINAL ARTICLE

# *Phenotypic evaluation of natural killer (NK) and natural killer T (NKT)-like cells in patients with peptic ulcer and gastric cancer caused by Helicobacter pylori infection*

Mojtaba Shadman[1],
Abolghasem Ajami[2],
Alireza Rafiei[3],
Hadi Hussein-Nattaj[1],
Vahid Hosseini[4],
Tarang Taghvaei[4],
Hamideh Mesali[1],
Mohsen Tehrani[5]

[1] MSc, Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD, Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] MD, Assistant Professor, Department of Immunology and Molecular and Cell Biology Research Center, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] MD, Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] MD, PhD, Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 11, 2013; Accepted January 8, 2014)

## *Abstract*

**Background and purpose:** The aim of this study was to compare the proportion of natural killer (NK) and natural killer T (NKT)-like cells in dyspeptic disorders caused by *Helicobacter pylori (H. pylori)*.

**Materials and methods:** In a case-control study, 27 patients with gastric cancer (GC), 25 patients with peptic ulcer (PUD), and 22 patients with non-ulcer dyspepsia (NUD) were enrolled. After endoscopic diagnosis, the proportions of NK cells subsets ($CD3^-CD56^+$ and $CD3^-CD16^+$), as well as NKT-like cells ($CD3^+CD56^+$) in peripheral blood were determined by flow cytometry. The frequency of $CD8^+$ and $CD8^-$ NK cell subsets were also determined. *H. pylori* infection was confirmed in all study subjects using the rapid urease test and histopathology**.**

**Results:** The frequencies of $CD3^-CD16^+$ NK, $CD3^-CD56^+$ NK, and $CD3^+CD56^+$ NKT-like cells in patients with gastric cancer infected by *H. pylori* were significantly lower than those in patients with non-ulcer dyspepsia ($P < 0.001$, $P = 0.050$, and $P = 0.020$, respectively). However, these cell populations showed no significant difference between the PUD and NUD groups. Further analysis showed that high numbers of $CD8^-$ NK cells in the blood were $CD56^+$ and $CD16^+$ phenotypes.

**Conclusion:** This study showed decreased numbers of NK and NKT-like cell populations in patients with gastric cancer compared to those with non-ulcer dyspepsia. It is thus suggested that these cells may limit the prolonged inflammation by *H. pylori*, which, in turn, reduce the risk of gastric cancer.

***Keywords:*** Dyspeptic disorders, *Helicobacter pylori*, NK cell, flow cytometry

**J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(110): 165-73(Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۱۰ اسفند سال ۱۳۹۲ (۱۷۳-۱۶۵)

# بررسی فنوتیپ سلول‌های Natural killer (NK) و شبه Natural killer T (NKT-like) در بیماران مبتلا به زخم پپتیک و سرطان معده ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری

مجتبی شادمان[۱]
ابوالقاسم عجمی[۲]
علیرضا رفیعی[۳]
هادی حسین نتاج[۱]
وحید حسینی[۴]
ترنگ تقوایی[۴]
حمیده مثالی[۱]
محسن طهرانی[۵]

## چکیده

**سابقه و هدف:** هدف از انجام این مطالعه، مقایسه کمی جمعیت‌های سلولی NK (Natural killer) و شبه NKT (Natural killer T-like) در اختلالات گوارشی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری است.

**مواد و روش‌ها:** از بین افرادی که به دلیل علایم سوء هاضمه در درمانگاه بیماری‌های گوارش تحت اندوسکوپی قرار گرفته بودند، ۲۷ نفر مبتلا به سرطان معده، ۲۵ نفر مبتلا به زخم پپتیک و ۲۲ نفر دارای علایم بالینی بدون زخم به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. عفونت هلیکوباکتر پیلوری با آزمایش اوره‌آز سریع و بیوپسی به اثبات رسید. میزان جمعیت سلول‌های NK با دو فنوتیپ $CD3^-CD56^+$ و $CD3^-CD16^+$ و سلول‌های شبه NK و همچنین، میزان بیان مولکول CD8 در سطح سلول‌های NK در خون محیطی افراد مورد مطالعه با روش فلوسایتومتری بررسی شد.

**یافته‌ها:** جمعیت‌های سلولی $CD3^-CD16^+$ NK، $CD3^-CD56^+$ NK و در بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت (به ترتیب $P < ۰/۰۰۱$، $P = ۰/۰۰۵$ و $P = ۰/۰۰۲$). اما این جمعیت‌های سلولی، در بیماران مبتلا به زخم معده در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین آنالیز میزان بیان مولکول CD8 نشان داد که غالب جمعیت‌های سلولی $CD16^+$ NK و $CD56^+$ NK در خون محیطی هر سه گروه مورد مطالعه، فاقد مولکول CD8 ($CD8^-$) هستند.

**استنتاج:** کاهش جمعیت سلول‌های NK و شبه NKT در بیماران مبتلا به سرطان معده نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. به نظر می‌رسد این سلول‌ها در کاهش التهاب مزمن ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری و جلوگیری از پیشرفت به سمت سرطان معده نقش داشته باشند.

**واژه های کلیدی:** سوء هاضمه، هلیکوباکترپیلوری، سلول Natural killer، فلوسایتومتری

**این مطالعه با بودجه طرح شماره ۱۳۸-۹۰ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد و نتیجه یک پایان‌نامه کارشناسی ارشد می باشد.**

**مولف مسئول: محسن طهرانی**- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی. E-mail: drmtehrani@gmail.com

۱. کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۱۲/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۰/۱۸

## مقدمه

بیماری‌های همراه با علایم سوء هاضمه (Dyspepsia) از قبیل رفلاکس معده به مری، گاستریت، زخم‌های معده و دوازدهه و سرطان معده از مشکلات عمده پزشکی هستند که آلودگی با باکتری هلیکوباکتر پیلوری یکی از عوامل دخیل در بروز آن‌ها شناخته شده است (۴-۱). پیامدهای بالینی این عفونت در معده طیف وسیعی دارد. بسیاری از افراد، بدون علامت بالینی می‌باشند و مخاط معده آن‌ها در بررسی اندوسکوپی طبیعی گزارش می‌شود. در حالی که برخی دیگر با علایم شدید سوء هاضمه مراجعه می‌کنند و در اندوسکوپی مخاط معده آن‌ها ممکن است زخم معده و در گروهی دیگر سرطان معده مشاهده شود (۳، ۲).

تفاوت پیامدهای بالینی ناشی از عفونت با هلیکوباکتر پیلوری به عوامل متعددی چون رژیم غذایی، عوامل اجتماعی-اقتصادی (۵)، عوامل بیماری‌زا در باکتری آلوده کننده (مانند CagA، VacA و ...) و ژنتیک میزبان نسبت داده می‌شود و همچنین ارتباط مستقیمی با ایمنی میزبان دارد (۶، ۳). در بین اجزای سیستم ایمنی میزبان، نقش انواع سلول‌های دخیل در ایمنی ذاتی از جمله سلول‌های NK (Natural killer) و شبه NKT (Natural killer T-like) در دفاع میزبان در مقابل باکتری و در ایجاد پیامدهای بالینی متفاوت شامل زخم معده، سرطان معده و یا مخاط معده‌ی طبیعی و بدون علامت بالینی مطرح می‌باشند (۹-۷).

سلول‌های NK لنفوسیت‌های اصلی سیستم ایمنی ذاتی هستند (۱۵-۵ درصد لنفوسیت‌های خون محیطی) که اولین خط دفاعی میزبان علیه تومورها (۱۱، ۱۰)، متاستازها (۱۳، ۱۲) و عفونت‌های ویروسی را تشکیل می‌دهند (۱۴). این سلول‌ها بر اساس میزان بیان مولکول‌های CD56 و CD16 به چندین جمعیت تقسیم‌بندی می‌شوند. آن چنان که پیشنهاد شده است، جمعیت $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK دارای خاصیت سلول‌کشی قابل توجهی در خون هستند. در حالی که عملکرد اصلی جمعیت سلول‌های $CD56^{bright}CD16^{-}$ NK با تولید سایتوکاین انجام می‌شود (۱۶، ۱۵). یک تقسیم‌بندی دیگر سلول‌های NK انسانی بر اساس حضور یا عدم حضور مولکول CD۸ بر سطح این سلول‌ها انجام می‌شود (۱). اطلاعات چندانی در مورد اختلاف عملکرد در این زیر جمعیت‌ها وجود نداشت تا این که در مطالعه‌ای نشان داده شد که بیان مولکول CD8 بر روی سلول‌های NK آپوپتوز را مهار می‌کند و فعالیت سلول‌کشی سلول را افزایش می‌دهد (۱۷).

سلول‌های شبه NKT با فنوتیپ $CD3^{+}CD56^{+}$ جمعیت کوچکی از لنفوسیت‌های خون محیطی (کمتر از ۱۰ درصد) را تشکیل می‌دهند، در حالی که به فراوانی در کبد (بیش از ۳۰ درصد) وجود دارند (۱۸). این سلول‌ها مانند لنفوسیت‌های $TCD8^{+}$ توانایی کشتن سلول‌های بدخیم را دارند و همچنین نشان داده شده است که سلول‌های شبه NKT با فنوتیپ $CD3^{+}CD56^{+}$ نقش مهمی در تخریب سلول‌های سرطانی به وسیله‌ی مکانیسم کشتن مستقیم سلولی ایفا می‌کنند (۱۹).

با توجه به این که سرنوشت افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری ممکن است ایجاد زخم معده، سرطان معده و یا مخاط معده‌ی طبیعی و بدون علامت بالینی باشد و نقش سلول‌های NK و شبه NKT در ایجاد این پیامدهای بالینی مختلف تا زمان اجرای پژوهش بررسی نشده بود، مطالعه حاضر با بررسی تعداد جمعیت‌های مختلف سلول‌های NK و شبه NKT در بیماران مبتلا به اختلالات مختلف گوارشی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری شامل زخم پپتیک و سرطان معده به بررسی نقش این سلول‌ها در شروع پاسخ‌های ایمنی سلولی و روند ایجاد این اختلالات می‌پردازد.

## مواد و روش‌ها

*بیماریابی و نمونه‌گیری*

در این مطالعه که به شکل مورد- شاهدی انجام شد، ۷۴ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. جمعیت مورد مطالعه از میان بیمارانی که جهت تشخیص علت ناراحتی‌های گوارشی خود به کلینیک طوبی و یا بیمارستان امام خمینی شهر ساری در طی

سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ مراجعه کرده بودند و بنا به نظر پزشک متخصص نیاز به اندوسکوپی معده داشتند، انتخاب شدند.

بیمارانی که وجود باکتری هلیکوباکتر پیلوری در دستگاه گوارش آن‌ها با آزمایش اوره‌آز سریع و بیوپسی به اثبات رسید و همچنین تحت درمان با داروهای سرکوب کننده‌ی ایمنی و یا دیگر روش‌های سرکوب ایمنی مانند رادیوتراپی و شیمی درمانی نبودند، وارد مطالعه شدند. تشخیص نوع عارضه بر اساس یافته‌های اندوسکوپی و تشخیص پاتولوژی انجام گرفت.

افراد مورد مطالعه در نهایت به سه گروه تقسیم شدند که شامل ۲۵ نفر بیمار آلوده به هلیکوباکتر پیلوری و دارای زخم پپتیک قابل تشخیص با اندوسکوپی، بیوپسی و پاتولوژی (گروه PUD یا Peptic ulcer disease)، ۲۷ نفر بیمار آلوده به هلیکوباکتر پیلوری و دارای سرطان معده قابل تشخیص با بیوپسی و پاتولوژی (گروه GC یا Gastric cancer) و ۲۲ نفر فرد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بدون عارضه گوارشی قابل تشخیص با اندوسکوپی و بیوپسی (گروه NUD یا Non-ulcer dyspepsia) به عنوان گروه شاهد بودند. پنج سی‌سی خون وریدی از هر یک بیماران دریافت شد و در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ریخته شد و برای بررسی فلوسایتومتری استفاده شد.

*فلوسایتومتری*

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های مورد بررسی توسط دستگاه فلوسایتومتری FACS Calibure چهار رنگی (ساخت شرکت بکتون دیکسنون BD، آمریکا) انجام گرفت. بدین منظور، ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی مورد نظر در لوله مخصوص فلوسایتومتری ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر خون تام تازه (با ضد انعقاد EDTA) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک دقیقه تکان داده شدند و به مدت ۴۰ دقیقه در یخچال در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول لیز کننده (خریداری شده از شرکت BD) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد.

در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور g ۳۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به طور کامل تخلیه شد و سلول‌ها در ۲ میلی‌لیتر بافر نمکی همراه با فسفات (PBS یا Phosphate buffered saline) سوسپانسیون شدند. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در دور g ۳۰۰، مایع رویی به طور کامل تخلیه شد و ۱ میلی‌لیتر محلول فیکس کننده پارافرمالدهید ۲ درصد اضافه شد. این نمونه‌ها حداکثر ۲۴ ساعت بعد، توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی شدند.

جهت شمارش تعداد سلول‌های NK و شبه NKT از آنتی‌بادی‌های کنژوگه با مواد فلورسنت شامل آنتی بادی‌های مونوکلونال موشی شامل Anti-Human CD3-FITC، Anti-Human CD8-PECy5، Anti-Human CD56-PE و Anti-Human CD16-PE به همراه آنتی بادی‌های کنترل موشی شامل IgG1κ-PE، IgG1κ-PE-Cy5 و IgG1κ-FITC استفاده شد. همه آنتی بادی‌ها از شرکت BD ساخت کشور آمریکا تهیه شدند. نمونه‌ها پس از خوانده شدن توسط نرم‌افزار Cell Quest در دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند. ابتدا محدوده لنفوسیت‌ها (Lymphocyte gate) بر اساس اندازه سلول‌ها و میزان گرانولیتی آن‌ها انتخاب شد و سپس میزان بیان جمعیت‌های سلول‌های NK $CD3^-CD16^+$ و NK $CD3^-CD56^+$ در نمودار چهار قسمتی (کوادرانت) مشخص شد و در نهایت، میزان توزیع هر جمعیت در نمودار هیستوگرام مربوط مولکول CD8 نیز تعیین گردید. در هر آنالیز، تعداد تقریبی ۱۰۰۰۰۰ سلول توسط دستگاه شمارش شد و درصد مطلق هر یک از لنفوسیت‌های مورد نظر با مارکرهای مشخص تعیین گردید.

*بررسی‌های آماری*

یافته‌های به دست آمده با استفاده از روش‌های توصیفی و آمار تحلیلی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که هدف اصلی، مقایسه نسبت جمعیت‌های سلولی NK و NKT در بین گروه‌های مختلف بیماری بود، تبدیل $2\text{Arcsin}(\sqrt{P})$ جهت تبدیل نسبت سلول‌ها به داده‌های با توزیع طبیعی استفاده شد (۲۰).

آزمون t برای مقایسه میزان توزیع مولکول CD8 در جمعیت‌های سلولی NK به کار رفت. آزمون‌های t و One-way ANOVA به ترتیب برای مقایسه تعداد سلول‌ها در دو یا چند گروه مستقل از هم استفاده گردید. همچنین برای مقایسه گروه شاهد با گروه زخم پپتیک و سرطان معده، از مقایسه‌های چندگانه Tukey و برای مقایسه عوامل کیفی و ارتباط آن با سه گروه بیماری از آزمون‌های $\chi^2$ و Fisher's exact استفاده شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه، ۷۴ بیمار مبتلا به اختلالات گوارشی و دارای هلیکوباکتر پیلوری در دستگاه گوارش، شامل ۳۰ نفر (۴۰/۵ درصد) مرد و ۴۴ نفر (۵۹/۵ درصد) زن، تحت آندوسکوپی و بیوپسی قرار گرفتند و بر اساس تشخیص پزشک متخصص در سه گروه زخم پپتیک (PUD) ۲۵ نفر (۳۳/۷۴ درصد)، سرطان معده (GC) ۲۷ نفر (۳۶/۴۸ درصد) و گروه شاهد (NUD) ۲۲ نفر (۲۹/۷۲ درصد) قرار گرفتند. اطلاعات کامل دموگرافیک بیماران و متغیرهای بررسی شده در آن‌ها به تفکیک گروه‌های بیماری در جدول شماره ۱ آمده است.

از تعداد ۲۷ نفر بیمار مبتلا به سرطان معده، اطلاعات یکی از افراد از دست رفته بود. در بقیه، تومور از نوع آدنوکارسینوما از نوع روده‌ای (Intestinal) بود. از نظر محل آناتومیک تومور، در ۱۸ نفر (۶۹/۲ درصد) تومور در محل کاردیا، در ۴ نفر (۱۵/۴ درصد) در محل فوندوس، در ۲ نفر (۷/۷ درصد) در محل آنتروم و در ۲ نفر (۷/۷ درصد) در محل بدنه معده قرار داشت. همچنین از نظر درجه بدخیمی (Grade) تومور، ۳ نفر (۱۱/۵ درصد) درجه ۱ (Well differentiated)، ۷ نفر (۲۶/۹ درصد) درجه ۲ (Moderately differentiated)، ۱۲ نفر (۴۶/۲ درصد) درجه ۳ (Poorly differentiated) و ۴ نفر (۱۵/۴ درصد) درجه ۴ (Undifferentiated) قرار گرفتند.

*بیان متمایز جمعیت‌های NK Cell و ارتباط آن‌ها با اختلالات گوارشی:*

در این مطالعه سلول‌های NK بر اساس بیان مولکول‌های CD16 و CD56 با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری چهار رنگی در دو جمعیت سلولی $CD3^-CD16^+$ NK و $CD3^-CD56^+$ NK مطالعه شدند و سپس برای آنالیز دقیق‌تر سلول‌های NK، توزیع مارکر CD8 در دو جمعیت پیش‌گفته بررسی شد.

چنان که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، درصد سلول‌های $CD3^-CD56^+$ NK در افراد مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌دار کاهش یافته بود (P = ۰/۰۰۵)، اما تفاوت آن در افراد مبتلا به زخم پپتیک در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود (P = ۰/۲۸۳). همچنین،

**جدول شماره ۱: اطلاعات دموگرافیک افراد مورد بررسی در مطالعه**

| متغیر | | گروه شاهد تعداد (درصد) | زخم پپتیک تعداد (درصد) | سرطان معده تعداد (درصد) | P |
|---|---|---|---|---|---|
| توزیع جنسی | مرد | ۷ (۳۱/۸۰) | ۹ (۳۶/۰۰) | ۱۴ (۵۱/۹۰) | ۰/۳۱۱ |
| | زن | ۱۵ (۶۸/۲۰) | ۱۶ (۶۴/۰۰) | ۱۳ (۴۸/۱۰) | |
| سن (میانگین ± انحراف معیار) | | ۵۰/۴۱ ± ۱۴/۵۳ | ۴۷/۲۰ ± ۱۸/۳۵ | ۵۴/۰۰ ± ۱۷/۲۶ | ۰/۰۱۸ |
| سابقه فامیلی* | | ۷ (۳۳/۳۳) | ۱۰ (۴۱/۶۰) | ۷ (۲۶/۹۲) | ۰/۵۴۵ |
| مصرف سیگار | | ۰ (۰) | ۲ (۳/۸۰) | ۵ (۱۹/۴۰) | ۰/۰۲۰ |
| ابتلا به دیابت | | ۲(۹/۱۰) | ۵ (۲۰/۰۰) | ۲ (۱۱/۸۰) | ۰/۹۳۱ |
| تعداد افراد خانواده** | | کمتر از ۴ نفر | کمتر از ۴ نفر | ۵ یا ۶ نفر | ۰/۰۱۱ |
| سطح تحصیلات** | | دیپلم | زیر سیکل | بی‌سواد | ۰/۰۰۱ |

* منظور از سابقه فامیلی، وجود بیماری‌های مرتبط با سوء هاضمه در فامیل درجه اول بیمار می‌باشد. ** شاخص میانه گزارش شده است.

**جدول شماره ۲: میانگین درصد فراوانی جمعیت‌های سلولی NK (Natural killer) و جمعیت سلولی NKT–like (Natural killer T-like) در خون محیطی گروه‌های مورد مطالعه**

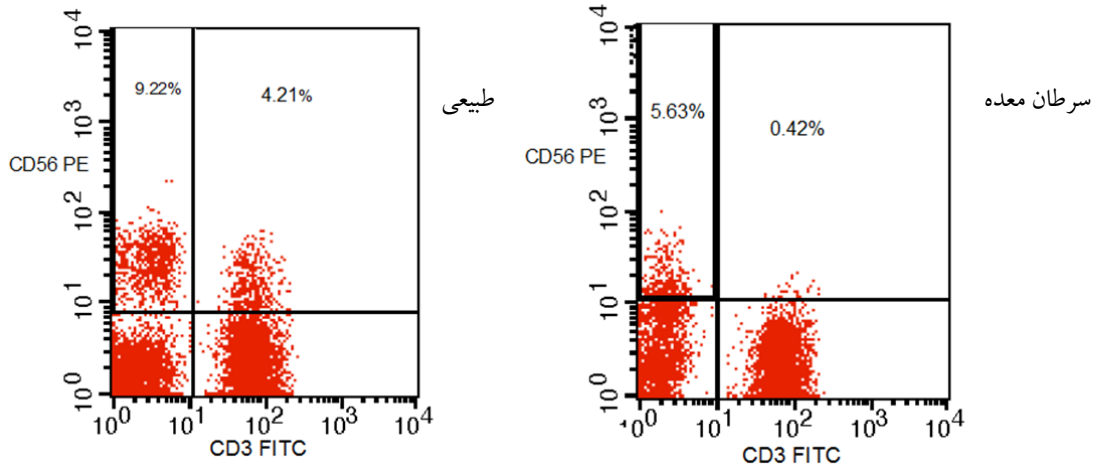
| گروه مورد مطالعه | سرطان معده | زخم پپتیک | گروه شاهد |
|---|---|---|---|
| نوع سلول | میانگین ±انحراف معیار | میانگین ±انحراف معیار | میانگین ±انحراف معیار |
| $CD3^-CD16^+$ NK | ۹/۹۰ ± ۲/۷۰*** | ۱۱/۵۱ ± ۴/۱۲** | ۱۴/۵۲ ± ۳/۲۸ |
| $CD3^-CD56^+$ NK | ۵/۲۶ ± ۲/۰۶* | ۹/۵۲ ± ۳/۴۰ | ۸/۱۴ ± ۳/۳۷ |
| $CD3^-CD56^+CD8^+$ NK | ۳۲/۰۸ ± ۱۲/۰۲ | ۴۱/۴۰ ± ۹۳/۹۰ | ۳۳/۴۰ ± ۱۴/۱۹ |
| $CD3^-CD56^+CD8^-$ NK | ۶۸/۱۳ ± ۱۲/۱۵ | ۵۸/۶۶ ± ۹/۹۸ | ۶۶/۵۶ ± ۱۴/۱۷ |
| $CD3^-CD16^+CD8^+$ NK | ۲۵/۱۴ ± ۱۷/۸۴ | ۲۲/۶۵ ± ۱۶/۰۴ | ۱۹/۷۶ ± ۱۴/۸۸ |
| $CD3^-CD16^+CD8^-$ NK | ۷۴/۹۶ ± ۱۷/۸۵ | ۷۷/۴۱ ± ۱۶/۰۴ | ۸۰/۲۴ ± ۱۴/۸۷ |
| $CD3^+CD56^+$ NKT-like | ۲/۰۶ ± ۱/۲۱* | ۳/۰۲ ± ۱/۶۳ | ۳/۶۶ ± ۱/۹۷ |

* $P < ۰/۰۵۰$؛ ** $P < ۰/۰۱۰$؛ *** $P < ۰/۰۰۱$

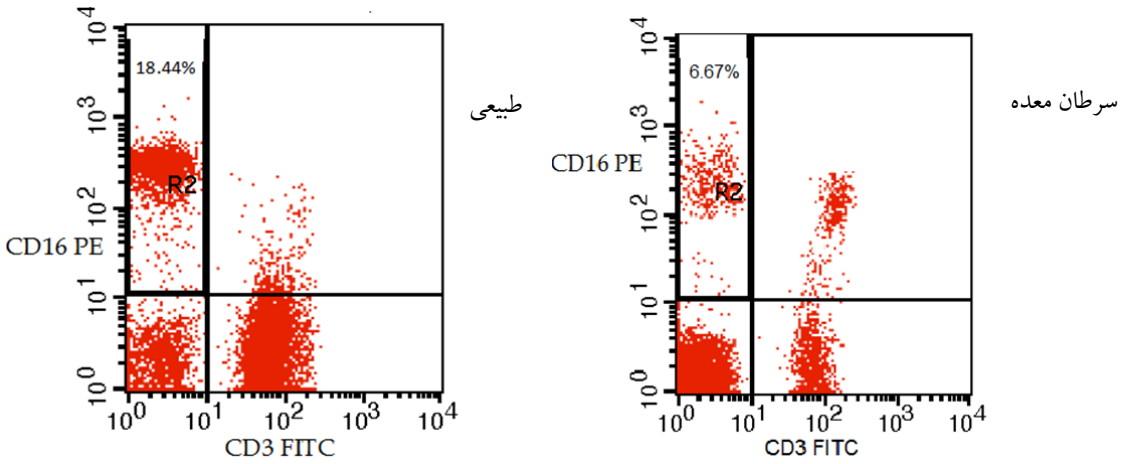
درصد سلول‌های $CD3^-CD16^+$NK در افراد مبتلا به سرطان معده در مقایسه با افراد گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < ۰/۰۰۱$) (تصاویر شماره ۱ و ۲)، در حالی که این درصد در افراد مبتلا به زخم پپتیک در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت ($P < ۰/۰۱$).

مقایسه فراوانی جمعیت‌های سلولی NK در خون محیطی افراد به طور جداگانه در هر یک از گروه‌های مورد نظر صورت گرفت و نشان داد که جمعیت سلولی $CD3^-CD16^+$ NK در هر سه گروه مورد مطالعه بیش از جمعیت سلولی $CD3^-CD56^+$ NK مشاهده می‌شود (جدول شماره ۲).

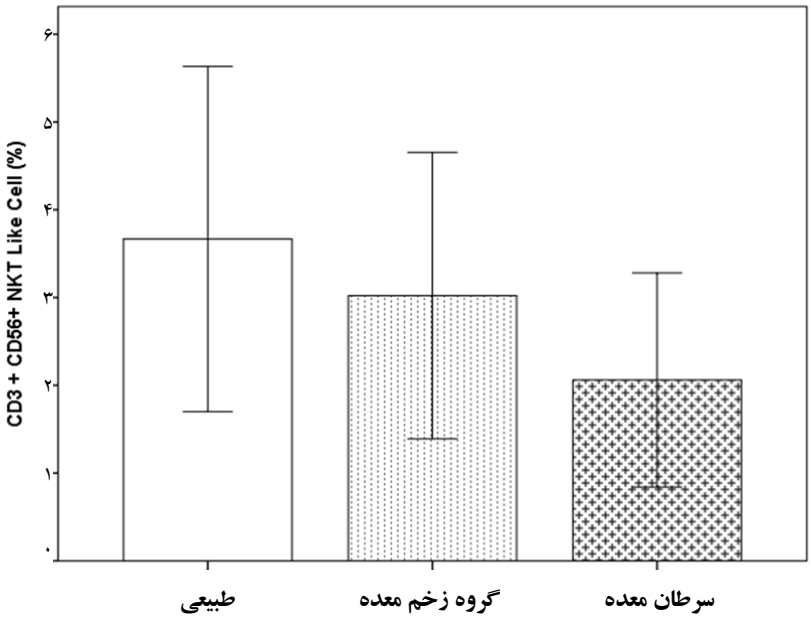
در مرحله بعد، بررسی میزان بیان مولکول CD8 در جمعیت‌های سلولی NK تعیین (جدول شماره ۲) و سپس میزان تغییرات کمی هر کدام از زیرجمعیت‌ها در گروه‌های بیماری مقایسه شد. بر طبق نتایج، مولکول CD8 در سطح هر دو جمعیت سلولی $CD3^-CD56^+$ NK و $CD3^-CD16^+$ NK بروز می‌یابد، اما جمعیت غالب از سلول‌های $CD3^-CD56^+$ NK و $CD3^-CD16^+$ NK در خون محیطی هر سه گروه شاهد، مبتلا به زخم پپتیک و سرطان معده، سلول‌های $CD8^-$ NK هستند. همچنین، مشاهده شد که جمعیت سلولی $CD3^-CD16^+CD8^-$ NK در بیماری سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌یابد، اما این افزایش معنی‌دار نبود ($P = ۰/۴۶۳$).




**تصویر شماره ۱: میزان فراوانی سلول‌های CD3-CD56+ NK در خون محیطی با استفاده از داده‌های حاصل از دستگاه فلوسایتومتری BD (کاهش میزان فراوانی این سلول‌ها در بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد و همچنین کاهش سلول‌های CD3+CD56+ NKT-like در گروه بیماران مبتلا به سرطان معده نسبت به گروه شاهد)**




**تصویر شماره ۲: میزان فراوانی سلول‌های CD3-CD16+ NK در خون محیطی با استفاده از داده‌های حاصل از دستگاه فلوسایتومتری BD (کاهش معنی‌داری میزان فراوانی این سلول‌ها در بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد)**




**نمودار شماره ۱: میزان توزیع سلول‌های NKT–like در گروه‌های مختلف بیماری. این نمودار نشان می‌دهد که میزان توزیع سلول‌های NKT–like در بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است (P = ۰/۰۰۲).**

در قسمت بعد میانگین درصد سلول‌های $CD3^{+}CD56^{+}$NKT-like در بین گروه‌های بیماری مقایسه شد. نتایج نشان داد که میانگین درصد این سلول‌ها در افراد مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود (P = ۰/۰۰۲)، اما مقایسه این سلول‌ها در بین گروه شاهد و مبتلا به زخم پپتیک معنی‌دار نبود (P = ۰/۳۶۱) (نمودار شماره ۱ و تصویر شماره ۱).

## بحث

پاسخ ایمنی علیه عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بروز تظاهرات بالینی متفاوت در معده نقش دارد. این تظاهرات بالینی از یک عفونت بدون علامت تا ایجاد التهاب، زخم و یا در برخی موارد سرطان معده متفاوت است (۳، ۲). نقش سلول‌های NK در دفاع مخاطی علیه عفونت هلیکوباکتر

پیلوری در برخی از مطالعات به اثبات رسیده است (۲۱). علاوه بر این، نشان داده شده است که فعالیت‌های سلول‌های NK در بیماران مبتلا به سرطان‌های مختلف از جمله سرطان معده، دچار نقص است (۲۲) و نیز تجویز داروهای ضد سرطان در بیماران مبتلا به سرطان معده، باعث افزایش تعداد و قدرت سلول‌کشی سلول‌های NK شده است (۲۳). برخی مطالعات، نقش سلول‌های NK و سلول‌های NKT را در دفاع میزبان در مقابل باکتری و ایجاد تظاهرات بالینی متفاوت شامل زخم معده، سرطان معده و یا عفونت بدون علامت مطرح کرده‌اند (۹-۷).

در این مطالعه، ابتدا جمعیت‌های سلولی $CD3^-CD16^+$ NK و $CD3^-CD56^+$ NK در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری در سه گروه شامل مبتلایان به زخم پپتیک، سرطان معده و افرادی که زخم یا سرطان در معده آن‌ها مشاهده نشده بود (گروه شاهد) بررسی شدند.

نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو جمعیت سلولی $CD3^-CD16^+$ NK و $CD3^-CD56^+$ NK در بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. در اکثر مطالعات، فعالیت سلول‌کشی سلول‌های NK بیشتر به جمعیت سلولی $CD3^-CD16^+$ NK و فعالیت تنظیمی و تولید سایتوکاین بیشتر به جمعیت سلولی $CD3^-CD56^+$ NK نسبت داده می‌شود (۲۱). در مطالعه حاضر، کاهش هر دو جمعیت سلول‌های NK در خون محیطی مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد کاهش تعداد سلول‌های NK و یا کاهش بیان مولکول‌های CD16 و CD56 به همراه کاهش هر دو فعالیت سلول‌کشی و تولید سایتوکاین، با بروز سرطان معده در ارتباط باشد.

از طرف دیگر، مقایسه جمعیت سلولی $CD3^-CD56^+$ NK در بیماران مبتلا به زخم پپتیک نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. مطالعه اخیری نشان داد که میانگین بیان مولکول CD56 در سلول‌های NK خون محیطی افراد آلوده به عفونت هلیکوباکتر پیلوری، بالاتر از افراد فاقد این عفونت است (۲۱). به نظر می‌رسد پاسخ ایمنی علیه هلیکوباکتر پیلوری در برخی افراد با توجه به زمینه ژنتیک فرد و یا عوامل ویرولانس باکتری شامل افزایش سلول‌های NK دارای مولکول CD56 باشد و این سلول‌ها با افزایش تولید سایتوکاین‌های التهابی، منجر به ادامه روند التهاب و ایجاد زخم شوند. اما در افراد دیگری که زمینه ژنتیک متفاوتی داشته باشند و یا عوامل ویرولانس باکتری در آن‌ها متفاوت باشد، پاسخ ایمنی علیه باکتری ممکن است با کاهش تعداد سلول‌های NK به همراه کاهش هر دو فعالیت سلول‌کشی و تولید سایتوکاین و در نتیجه با بروز سرطان معده در ارتباط باشد.

همچنین در این مطالعه، میزان بیان مولکول CD8 در جمعیت های سلولی NK تعیین شد و مشاهده گردید که بیان مولکول CD8 در سطح اکثر سلول‌های NK با فنوتیپ‌های $CD3^-CD56^+$ NK و $CD3^-CD16^+$ NK درخون محیطی هر سه گروه مبتلا به زخم پپتیک، سرطان معده و گروه شاهد، بسیار کم بود و بنابراین، جمعیت سلول‌های $CD3^-CD16^+CD8^-$ NK به فراوانی مشاهده شدند (جدول شماره ۲). این جمعیت در بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد افزایش نشان داد، اما این افزایش معنی‌دار نبود (جدول شماره ۲). هم جهت با نتایج این مطالعه، مطالعه Lindgren و همکاران نشان داد که سلول‌های NK فاقد مولکول CD8 (سلول‌های $CD8^-$NK) به طور غالب در خون محیطی حضور دارند و در محیط آزمایشگاه می‌توانند با تولید IFN-γ (Interferon gamma) بیش از سلول‌های $CD8^+$ NK به باکتری‌ها پاسخ دهند (۲۴)، اما در مطالعه Addison و همکاران نشان داده شده است که سلول‌های NK دارای مارکر CD8، فعالیت سلول‌کشی بیشتری از سلول‌های NK فاقد مولکول CD8 دارند (۱۷). به عبارتی، بروز مولکول CD8 خاصیت سلول‌کشی سلول‌های NK را افزایش می‌دهد؛ اما Jonges و همکاران اختلاف معنی‌داری در بیان این مولکول درجمعیت‌ها گزارش نکرده‌اند (۱۶). این اختلاف نظر می‌تواند ناشی از تفاوت در روش‌های آنالیز داده‌های فلوسایتومتری باشد که می‌تواند توزیع سلول‌های هم‌پوشان را به صورت متفاوت $CD56^{bright}$ و $CD56^{dim}$ یا به صورت مطلق $CD56^+$ و $CD56^-$ گزارش کند.

در این مطالعه، همچنین نشان داده شد که میانگین درصد سلول‌های شبه NKT در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد. این سلول‌ها در واقع زیر گروهی از سلول‌های $TCD3^+$ دارای نشانگر سلولی $CD56^+$ هستند که مانند سلول‌های NK، دارای خاصیت سلول‌کشی علیه سلول‌های توموری هستند و تحت عنوان سلول‌های شبه NKT (NKT-like Cells) نام‌گذاری می‌شوند (۲۵).

با وجود این که این سلول‌ها درصد کمی از لنفوسیت‌های خونی را تشکیل می‌دهند، اما به واسطه تولید سایتوکاین IFN-γ و خاصیت سلول‌کشی قوی، نقش مهمی در دفاع علیه سلول‌های توموری از خود نشان می‌دهند که این فعالیت سلول‌کشی به گیرنده‌های NKG2D در سطح این سلول‌ها نسبت داده می‌شود (۱۹). گیرنده‌های NKG2D علاوه بر سلول‌های NK و در سطح سلول‌های $TCD8^+$ و NKT $CD3^+CD56^+$ نیز حضور دارد (۱۹).

کاهش این سلول‌ها با توجه به خاصیت سلول‌کشی آن‌ها و تولید سایتوکاین‌های التهابی، به احتمال زیاد مرتبط با سلول‌های توموری و عوامل محلول مشتق از تومور است که علاوه بر فرار تومور از دسترس سیستم ایمنی، سبب فروتنظیمی NKG2D در سطح سلول‌های شبه NKT و در نتیجه مهار فعالیت سلولی می‌شوند.

در این مطالعه نشان داده شد که میزان کمی جمعیت‌های سلولی NK و شبه NKT در بیماران مبتلا به سرطان معده نسبت به گروه شاهد کاهش داشت. بنابراین، به نظر می‌رسد که این سلول‌ها در کاهش التهاب مزمن ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری و در نتیجه جلوگیری از پیشرفت به سمت ایجاد سرطان معده نقش داشته باشند. در این راستا، بررسی هم زمان کمی جمعیت‌های سلولی NK و عملکرد آن‌ها در پاسخ به هلیکوباکتر پیلوری در آینده، می‌تواند دیدگاه روشنی از نقش اختصاصی‌تر هر یک از این جمعیت‌ها در عوارض گوارشی مختلف ارایه کند.

## سپاسگزاری

از همکاری کارکنان بخش اندوسکوپی و آزمایشگاه کلینیک فوق تخصصی طوبی و بیمارستان امام خمینی ساری که در انجام این طرح همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

## References

1. Lindgren A, Yun CH, Lundgren A, Sjoling A, Ohman L, Svennerholm AM, et al. CD8- natural killer cells are greatly enriched in the human gastrointestinal tract and have the capacity to respond to bacteria. J Innate Immun 2010; 2(3): 294-302.
2. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. J Clin Invest 2007; 117(1): 60-9.
3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 449-90.
4. Selgrad M, Bornschein J, Rokkas T, Malfertheiner P. Clinical aspects of gastric cancer and Helicobacter pylori--screening, prevention, and treatment. Helicobacter 2010; 15 Suppl 1: 40-5.
5. Hamajima N, Naito M, Kondo T, Goto Y. Genetic factors involved in the development of Helicobacter pylori-related gastric cancer. Cancer Sci 2006; 97(11): 1129-38.
6. O'Keeffe J, Moran AP. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to Helicobacter pylori. Helicobacter 2008; 13(1): 1-19.
7. Lindgren A, Yun CH, Sjoling A, Berggren C, Sun JB, Jonsson E, et al. Impaired IFN-gamma production after stimulation with bacterial components by natural killer cells from gastric cancer patients. Exp Cell Res 2011; 317(6): 849-58.
8. Pellicano A, Sebkova L, Monteleone G, Guarnieri G, Imeneo M, Pallone F, et al. Interleukin-12 drives the Th1 signaling pathway in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. Infect Immun 2007; 75(4): 1738-44.
9. Yun CH, Lundgren A, Azem J, Sjoling A, Holmgren J, Svennerholm AM, et al. Natural killer cells and Helicobacter pylori infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. Infect Immun 2005; 73(3): 1482-90.
10. Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, Strominger JL. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(10): 5640-4.
11. Morelli L, Lemieux S. Triggering of the cytotoxic activity of murine natural killer and lymphokine-

activated killer cells through the NK2.1 antigen. J Immunol 1993; 151(12): 6783-93.
12. Smyth MJ, Thia KY, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA, et al. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. J Immunol 1999; 162(11): 6658-62.
13. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood 2001; 97(1): 192-7.
14. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol 1999; 17: 189-220.
15. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood 2001; 97(10): 3146-51.
16. Jonges LE, Albertsson P, van Vlierberghe RL, Ensink NG, Johansson BR, van de Velde CJ, et al. The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. Scand J Immunol 2001; 53(2): 103-10.
17. Addison EG, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S, et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. Immunology 2005; 116(3): 354-61.
18. Satoh M, Seki S, Hashimoto W, Ogasawara K, Kobayashi T, Kumagai K, et al. Cytotoxic gammadelta or alphabeta T cells with a natural killer cell marker, CD56, induced from human peripheral blood lymphocytes by a combination of IL-12 and IL-2. J Immunol 1996; 157(9): 3886-92.
19. Wang H, Yang D, Xu W, Wang Y, Ruan Z, Zhao T, et al. Tumor-derived soluble MICs impair CD3(+)CD56(+) NKT-like cell cytotoxicity in cancer patients. Immunol Lett 2008; 120(1-2): 65-71.
20. Neter J, Wasserman W, Kutner MH. Applied Linear Statistical Models. New York, NY: WCB/McGraw-Hill; 1996.
21. Rudnicka K, Matusiak A, Miszczyk E, Rudnicka W, Tenderenda M, Chmiela M. Immunophenotype of peripheral blood natural killer cells and IL-10 serum levels in relation to Helicobacter pylori status. APMIS 2013; 121(9): 806-13.
22. Izawa S, Kono K, Mimura K, Kawaguchi Y, Watanabe M, Maruyama T, et al. H(2)O(2) production within tumor microenvironment inversely correlated with infiltration of CD56(dim) NK cells in gastric and esophageal cancer: possible mechanisms of NK cell dysfunction. Cancer Immunol Immunother 2011; 60(12): 1801-10.
23. Xu JW, Li CG, Huang XE, Li Y, Huo JG. Ubenimex capsule improves general performance and chemotherapy related toxicity in advanced gastric cancer cases. Asian Pac J Cancer Prev 2011; 12(4): 985-7.
24. Lindgren A, Yun CH, Lundgren A, Sjöling A, Ohman L, Svennerholm AM, et al. CD8- natural killer cells are greatly enriched in the human gastrointestinal tract and have the capacity to respond to bacteria. J Innate Immun 2010; 2(3):294-302.
25. Jing Y, Gravenstein S, Chaganty NR, Chen N, Lyerly KH, Joyce S, et al. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. Exp Gerontol 2007; 42(8): 719-32.