ORIGINAL ARTICLE

Study of Regulatory T cells in Patients with Crohn Disease

Ali Khalili[1],
Mousa Mohammadnia-Afrouzi[2],
Iradj Maleki[3],
Vahid Hosseini[4],
Tarang Taghvaei[4]
Hadi Hossein-Nattaj[5],
Saied Abediankenari[6]

[1] MSc Student in Immunology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Immunology and Microbiology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[3] Associate Professor, Department of Internal Medicine, Gut and Liver Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Gut and Liver Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] MSc in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Associate Professor, Department of Immunology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 30, 2015 Accepted November 15, 2015)

Abstract

Background and purpose: Crohn disease (CD) is an autoimmune disorder in which a failure of tolerance to the intestinal antigens plays a pivotal role in the pathogenesis of this disease. Treg cells control immune responses to self and foreign antigens and have an important role in maintaining self-tolerance. In this study we evaluated the frequency of Tregs in the peripheral blood of patients with Crohn disease compared with healthy control group.

Materials and methods: In a case-control study, 18 patients with Crohn disease and 20 healthy volunteers were enrolled. Blood sampling was done in both patients and controls and peripheral blood mononuclear cells were isolated. Then, the frrequency of $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}CD127^{low/-}$ Tregs and $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{-}$ activated effector T cells were evaluated by flow cytometry. Data analysis was performed in GraphPad Prism and SPSS.

Results: The results showed that the frequency of Treg cells in the peripheral blood of CD patients was significantly lower compared to that of the healthy controls. In addition, a significant decrease in Treg/activated effector T cells ratio was observed in CD patients compared to controls.

Conclusion: The results showed that Crohn disease is associated with a decrease in the peripheral blood Tregs pool. Moreover, it seems that the balance between Tregs and effector T cells is disturbed in CD patients.

Keywords: Crohn disease, Regulatory T cells, Flow cytometry

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(131): 98-107 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۱ آذر سال ۱۳۹۴ (۱۰۷-۹۸)

بررسی تعداد سلول‌های T تنظیمی در بیماران مبتلا به بیماری کرون

علی خلیلی[۱]
موسی محمدنیا افروزی[۲]
ایرج ملکی[۳]
وحید حسینی[۴]
ترنگ تقوایی[۴]
هادی حسین نتاج[۵]
سعید عابدیان کناری[۶]

چکیده

سابقه و هدف: کرون یک بیماری اتوایمیون می‌باشد که شکست تحمل نسبت به آنتی‌ژن‌های روده‌ای، نقشی محوری در پاتوژنز این بیماری ایفاء می‌کند. سلول‌های T تنظیمی (Treg) پاسخ های ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی و بیگانه را کنترل می‌کنند و نقش مهمی در حفظ تحمل به خود دارند؛ لذا در این مطالعه، فراوانی سلول‌های Treg در خون محیطی بیماران کرون در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مورد شاهدی، تعداد ۱۸ نفر از بیماران مبتلا به بیماری کرون و ۲۰ نفر داوطلبین سالم، انتخاب شدند. سلول‌های تک هسته ای خون محیطی این افراد جدا گردید و سپس فراوانی سلول های Treg با شاخص‌های $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ و سلول‌های T اجرایی فعال شده با شاخص‌های $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ در خون محیطی بیماران کرون و گروه کنترل با فلوسیتومتری بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای GraphPad Prism و SPSS آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فراوانی سلول‌های Treg در خون محیطی بیماران کرون در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کم‌تر بود. هم چنین یک کاهش معنی‌دار در نسبت سلول‌های Treg به سلول‌های T اجرایی فعال شده در بیماران کرون در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.

استنتاج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری کرون با کاهش ذخیره سلول‌های Treg خون محیطی مرتبط می‌باشد. هم‌چنین به نظر می‌رسد که تعادل و بالانس بین سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های T اجرایی فعال شده در این بیماران مختل می‌باشد.

واژه های کلیدی: بیماری کرون، سلول‌های T تنظیمی، فلوسیتومتری

مقدمه

بیماری کرون (CD یا Crohn's disease) یک بیماری اتوایمیون التهابی مزمن و عودکننده دستگاه گوارش می‌باشد که می‌تواند هر بخشی از دستگاه گوارش را گرفتار کند، اما اغلب ایلئوم و کولون را درگیر می‌کند.

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۵۳۵ - ۹۱ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: سعید عابدیان کناری- ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. دانشیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۶/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۶/۱۵ تاریخ تصویب ۱۳۹۴/۸/۲۴

این بیماری متعلق به خانواده بیماری‌های التهابی روده (IBDs یا Inflammatory Bowel Disesaes) می باشد. IBD دو بیماری اصلی، بیماری کرون و کولیت اولسراتیو (UC یا ulcerative colitis) را شامل می شود. برخلاف کولیت اولسراتیو، التهاب در بیماری کرون اغلب ناپیوسته بوده و در تمامی لایه های دیواره دستگاه گوارش (transmural) بروز می کند. اوج شروع بیماری برای هر دو جنس در دهه‌های دوم و سوم زندگی می‌باشد(۳-۱). متاسفانه آمار دقیقی در خصوص میزان بروز و شیوع این بیماری در ایران موجود نیست؛ اما مطالعات انجام شده دلالت بر آن دارد که میزان بروز آن در کشور رو به افزایش می‌باشد(۴). در حال حاضر بیش تر از درمان‌های دارویی از قبیل آمینوسالیسیلات‌ها و کورتیکواستروئیدها در این بیماران استفاده می‌شود. از طرف دیگر، معرفی عوامل درمانی بیولوژیک مانند infliximab (Anti-TNF-α) امکان بالقوه‌ای را جهت درمان بیماران فراهم آورده است، اما هنوز درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و این داروها اغلب با یک مجموعه قابل توجهی از اثرات جانبی همراه می‌باشند(۶،۵). اگرچه علت دقیق بیماری هنوز به طور کامل مشخص نمی‌باشد، به نظر می‌رسد مجموعه‌ای از فاکتورهای ژنتیکی، محیطی و ایمونولوژیکی در ایجاد بیماری نقش داشته باشند(۷،۱). شواهد زیادی نشان می‌دهد که بیماری کرون ناشی از پاسخ‌های ایمنی مخاطی نامناسب به باکتری‌های کومنسال روده‌ای در اشخاص مستعد از نظر ژنتیکی می‌باشد که منجر به التهاب روده‌ای مزمن می‌شود. شواهد موجود دلالت بر این دارند که بیماری کرون از التهاب وابسته به Th1 و یا Th17 ناشی می‌شود(۹،۸،۶). شکست تحمل (immunological tolerance) نسبت به آنتی‌ژن‌های روده‌ای، نقش محوری را در پاتوژنز بیماری کرون ایفاء می کند(۱۱،۱۰). سلول های T تنظیمی (Treg) پاسخ‌های ایمنی را از طریق مهار تکثیر و عملکردهای اجرایی سلول‌های T دیگر کنترل می کنند و نقش مهمی در حفظ تحمل به خود ایفاء می کنند(۱۲). لذا تحمل ناقص می‌تواند به علت نقص در سلول‌های Treg باشد. سلول‌های Treg یک زیرگروه از سلول‌های T با شاخص‌های $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}CD127^{low/-}$ می‌باشند که پاسخ‌های ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی و بیگانه را کنترل می کنند. سلول‌های Treg با بیان فاکتور نسخه برداری FoxP3 شناخته می‌شوند که برای ایجاد و عملکرد این سلول‌ها ضروری است(۱۶-۱۳). CD25 نه تنها توسط سلول‌های Treg بیان می‌شود، بلکه هم‌چنین بر سطح سلول‌های T فعال شده نیز فرا تنظیمی (upregulate) می گردد؛ بنابراین CD25 یک مارکر انحصاری برای سلول‌های Treg نمی‌باشد(۱۸،۱۷). CD127 (زنجیره α پذیرنده IL-7) بر سطح اغلب سلول‌های T بالغ بیان می‌شود و نقش مهمی در تکثیر و تمایزشان ایفاء می کند؛ به هر حال بیان CD127 بر سطح سلول‌های Treg کم یا منفی ($CD127^{low/-}$) می باشد و بیانش به‌طور معکوسی با بیان FoxP3 مرتبط است(۲۱-۱۹). عملکردهای تنظیمی سلول‌های Treg از طریق تماس سلول به سلول، مصرف IL-2 و هم‌چنین ترشح سایتوکاین‌های مهاری نظیر TGF-β و IL-10 میانجی گری می‌شود(۲۵-۲۲).

اهمیت سلول‌های Treg در حفظ هومئوستاز روده‌ای اولین بار با آزمایشات انجام شده به وسیله Powrie و همکارانش مشخص شد. در این آزمایشات، انتقال انتخابی (adoptive transfer) سلول‌های T اجرایی مبتدی به موش‌های دارای نقص ایمنی در غیاب سلول‌های Treg به کولیت منجر شد که البته وابسته به حضور باکتری‌های روده‌ای بود؛ در حالی که انتقال همزمان سلول‌های T اجرایی و Treg از القاء بیماری جلوگیری کرد. علاوه بر این، انتقال سلول‌های Treg پس از القاء بیماری، التهاب روده‌ای را در یک رفتار وابسته به IL-10 و TGF-β درمان کرد(۲۸-۲۶). شاید یکی از بهترین شواهدی که نقص عملکردی سلول های Treg را در بیماری التهابی روده انسان نشان می‌دهد، از مطالعه بیماران مبتلا به سندروم immune dysregulation, polyendocrinopathy, IPEX)

enteropathy, X-linked) به دست آمد. بیماری انسانی IPEX یک بیماری نقص ایمنی اولیه به دلیل جهش‌هایی در ژن FoxP3 می‌باشد. در نتیجه، این بیماران فاقد سلول‌های Treg عملکردی بوده و از اختلالات خود ایمنی چند ارگانی، شامل نقایص روده‌ای شدید رنج می‌برند(۳۱-۲۹). با توجه به مشخص نبودن علت دقیق بیماری، نبود درمان‌های قطعی و شیوع رو به افزایش بیماری کرون و از طرفی نقش بسیار مهم سلول‌های Treg در بیماری‌های اتوایمیون، در این مطالعه فراوانی سلول‌های Treg بر اساس شاخص‌های $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}CD127^{low/-}$ برای اولین بار در کشور در خون محیطی بیماران مبتلا به بیماری کرون در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

انتخاب بیماران

در یک مطالعه تحلیلی مورد شاهدی، تعداد ۱۸ نفر از بیماران مبتلا به بیماری کرون که به علت ناراحتی‌های گوارشی به کلینیک تخصصی باغبان (طوبی)، مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره)، کلینیک مازیار و درمانگاه تخصصی پرتومازند شهرستان ساری در سال ۹۳-۹۲ مراجعه کرده بودند، انتخاب شده بودند. تشخیص بیماری بر اساس معیارهای تثبیت شده شامل سابقه بالینی، یافته‌های فیزیکی و آزمایشگاهی، اندوسکوپی، رادیولوژی و هیستوپاتولوژی بوده است. هیچ یک از بیماران دارویی در رابطه با بیماری‌شان تا قبل از نمونه‌گیری دریافت نکرده بودند. معیارهای خروج از مطالعه شامل مصرف هرگونه داروی مرتبط با بیماری و سابقه بیماری‌های خودایمن یا زمینه‌ای بوده است. تعداد ۲۰ نفر داوطلب سالم که از نظر سن، جنس، نژاد و خصوصیات دموگرافیک و منطقه جغرافیایی با گروه بیماران همسان‌سازی شده بودند، به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. پس از کسب رضایت آگاهانه، از هر فرد ۵ میلی لیتر خون محیطی جهت انجام آزمایش‌ها گرفته شد.

جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs)

۵-۴ میلی لیتر خون کامل با استفاده از بافر PBS (Phosphate buffered saline) به نسبت ۱:۱ رقیق شده و با استفاده از پیپت پاستور به آرامی از جداره لوله، خون رقیق شده را به لوله حاوی ۴-۳ میلی‌لیتر فایکول (1.077 g/mL، Biosera، انگلستان) اضافه می‌کنیم. سپس به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دور g ۴۰۰و دمای اتاق، سانتریفیوژ کرده و لایه حاوی سلول‌های تک هسته‌ای (حلقه شیری رنگ) را با استفاده از پیپت پاستور یا سمپلر جدا کرده و ۳-۲ بار با PBS شستشو (۷-۵ دقیقه در دور g۳۰۰) می‌دهیم. سپس سلول‌های جدا شده به وسیله لام نئوبار شمارش می‌شوند.

ارزیابی فلوسیتومتریک سلول های Treg ($CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}CD127^{low/-}$)

پس از تهیه سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای در بافر رنگ آمیزی (PBS حاوی ۱ درصد از FBS (fetal bovine serum))، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی حاوی ۲×۱۰^{۵} سلول به هر یک از لوله‌های تست و ایزوتایپ کنترل اضافه می‌کنیم. سپس سلول‌ها را با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه با مواد فلورسنت شامل FITC-conjugated anti-CD127 (کلون eBioRDR5)، Anti CD25-PE/Cy7 (کلون BC96) و Anti CD4-APC (کلون RPA-T4) یا ایزوتایپ کنترل‌های مربوطه (Mouse IgG1, kappa) رنگ آمیزی می‌کنیم. تمامی آنتی‌بادی‌ها و ایزوتایپ کنترل ها از شرکت eBioscience (USA) خریداری شدند. مخلوط حاصل را به آرامی ورتکس کرده و به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای°C ۴ انکوبه می‌گردد. سپس سلول‌ها دو بار با بافر رنگ‌آمیزی در دور g ۳۰۰ به مدت ۷-۵ دقیقه سانتریفیوژ و شستشو شده و در ۱۰۰ میکرولیتر بافر به صورت سوسپانسیون در می‌آید. برای رنگ‌آمیزی داخل سلولی، ابتدا سلول‌ها را ثابت (fixation) و نفوذپذیر می‌نماییم. ۱ میلی‌لیتر محلول

کـار FoxP3 Fixation/Permeabilization (eBioscience) را به لوله‌ها اضافه کـرده و در تـاریکی و دمـای ۴ °C یـا دمـای اتـاق بـه مـدت ۶۰-۳۰ دقیقـه انکوبـه مـی‌کنـیم. سلول‌ها را با اضافه کردن بافر Permeabilization دو بار شستشـو داده و در ۱۰۰ میکرولیتـر بـافر بـه صـورت سوسپانسیون در می‌آوریم. سپس سلول‌ها را با ۵ میکرولیتـر از آنتـی‌بـادی مونوکلونـال Anti FoxP3-PE (کلـون 236A/E7) یـا ایزوتایـپ کنتـرل مربوطـه رنـگ‌آمیـزی می‌نماییم. مخلوط حاصل را به آرامی ورتکس کـرده و به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبـه و سلول هـا را دو بـار بـا بـافر Permeabilization شستشـو می‌دهیم و در ۲-۱ میلی‌لیتر بافر رنگ آمیزی به صـورت سوسپانسیون در می‌آوریم. سپس سـلول‌هـا را بـه منظـور ارزیـابی فراوانـی سـلول‌هـای Treg در خـون محیطـی بیمـاران و گـروه کنتـرل، بـا دسـتگاه فلوسـیتومتر (FACSCalibur، BD Biosciences، USA) و با استفاده از نرم‌افزارهـای BD CellQuest (BD Biosciences) و FlowJo (Tree Star، USA) مورد آنالیز قرار می‌دهـیم. ابتدا لنفوسیت‌ها بر اساس ویژگی‌هـای forward scatter و side scatter انتخاب (gate) شدند؛ سپس گیـت‌هـای بـیش‌تـری بـر اسـاس بیـان مارکرهـای CD4 و CD25 صورت می‌گیرد و در نهایت فراوانـی سـلول‌هـای Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ به صورت درصدی از سلول‌های $CD4^+$ محاسبه می‌شوند.

تحلیل آماری

نتایج به‌صورت میانگین وانحراف‌معیار (mean ± SD) ارائـه شـدند. داده‌هـا بـا اسـتفاده از نـرم‌افزارهـای GraphPad Prism (GraphPad، USA) و SPSS (SPSS Inc، USA) آنالیز شـدند. آنالیزهـای آمـاری بـا استفاده از تست‌هـای پارامتریـک unpaired t test بـرای متغیرهایی کـه از توزیـع نرمـال برخـوردار بودنـد، و نـان پارامتریک Mann-Whitney test برای متغیرهایی که از توزیع نرمال برخوردار نبودند، صورت گرفت. $p < ۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

از مجموع ۳۸ فـرد شـرکت‌کننـده در ایـن مطالعـه، تعداد ۱۸ نفر مبتلا به بیماری کرون (گـروه مـورد) و ۲۰ نفر داوطلب سالم (گروه شاهد یا کنترل) بودند کـه ایـن دوگروه از نظر سن، جنس وسایر خصوصیات دموگرافیک همسان‌سازی شـده بودنـد. فراوانـی سـلول‌هـای Treg بـا تکنیـک فلوسـیتومتری مـورد ارزیـابی قـرار گرفـت. مشخصات دموگرافیک و یافته‌های آزمایشـگاهی گـروه بیماران و کنترل در جدول شماره ۱ بیان شده است.

به منظور ارزیابی فراوانی سلول های Tregدر خـون محیطی بیماران کرون و گروه کنترل، سـلول هـای تـک هسته‌ای خون محیطـی را بـا آنتـی‌بـادی‌هـای منوکلونـال کونژوگه با رنگ‌های فلوروکروم بر ضـد شـاخص‌هـای CD4، CD25، FoxP3 و CD127 رنگ آمیزی کرده و بـا دسـتگاه فلوسـیتومتری شـرکت BD درصـد فراوانـی سلول های Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ را به دست آوردیم (تصویر شماره ۱ و جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: ویژگی های گروه بیماران و کنترل

خصوصیات	بیماران کرون	گروه کنترل سالم	سطح معنی داری
تعداد	۱۸	۲۰	
میانگین سنی (سال)	۳۶/۶۱ ± ۱۰/۵۸	۳۵/۷ ± ۹/۶۱	۰/۷۸۲۵
رنج سنی (سال)	۶۳-۱۹	۵۶-۲۳	
جنس			
مرد تعداد (درصد)	۱۰ (۵۵/۵۶)	۱۱ (۵۵)	
زن تعداد (درصد)	۸ (۴۴/۴۴)	۹ (۴۵)	
WBC ($\times 10^3/\mu L$)	۸/۶۹ ± ۱/۰۳	۷/۴۵ ± ۱/۲۴	۰/۰۰۲۸*
درصد لنفوسیت‌ها (WBC differential)	۲۸/۴۴ ± ۴/۶	۳۱/۶ ± ۴/۵۲	۰/۰۴۰۲*

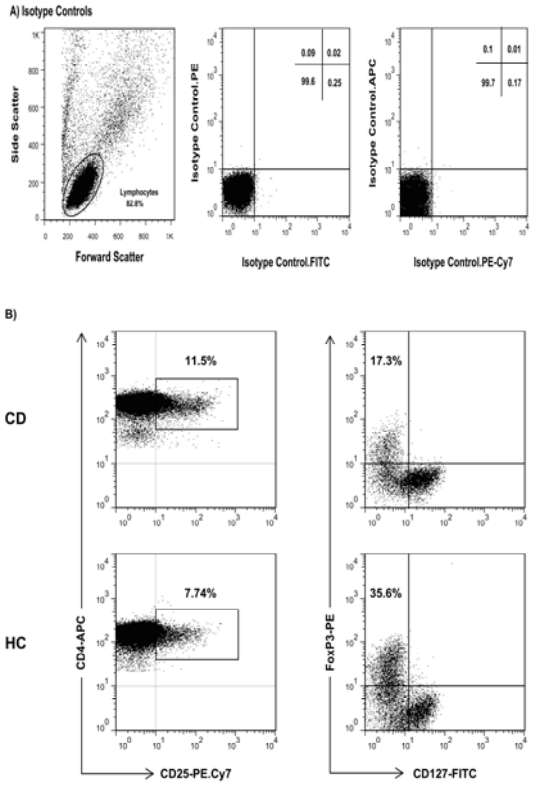
داده ها به صورت mean ± SD ارائه شده است.

*: $p < ۰/۰۵$

جـدول شـماره ۲: فراوانـی زیرگـروه هـای سـلول هـای T در خـون محیطی بیماران کرون و گروه کنترل

$CD4^+$ T cells subpopulations	بیماران کرون انحراف‌معیار±میانگین	گروه کنترل سالم انحراف‌معیار±میانگین	سطح معنی‌داری
$CD4^+$ cells (% of lymphocytes)	۳۹/۴۶±۶/۵۷	۴۱/۵۹±۵/۶	۰/۴۰۴۹
$CD4^+CD25^+$ cells (in $CD4^+$ T cells)	۷/۹۸±۲/۷۹	۶/۸۷±۱/۵۶	۰/۱۳۵۴
$CD4^+CD25^+FoxP3^-$ activated Teff cells (in $CD4^+$ T cells)	۵/۲۷±۲/۲۵	۳/۷۴±۱/۳۸	*۰/۰۳۰۴
$CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ Treg cells (in $CD4^+$ T cells)	۲/۱۷±۰/۸۷	۲/۹۵±۱/۰۹	*۰/۰۲۰۶
Ratio of Treg / activated Teff cells	۰/۴۵۲±۰/۱۸	۰/۸۸۷±۰/۴۳	*۰/۰۰۰۱

*: $p < ۰/۰۵$ Teff: effector T cells



تصویر شماره ۱: فراوانی سلول های Treg در بیماران کرون و گروه کنترل. ابتدا لنفوسیت ها و سلول های $CD4^+$ T انتخاب (gate) شدند (شکل نشان داده نشده است). سپس در داخل این سلول ها، سلول‌های $CD4^+CD25^+$ گیت شدند و در نهایت فراوانی سلول‌های $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ Treg به صورت درصدی از سلول‌های $CD4^+$ T محاسبه شد

همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فراوانی سلول‌های $CD4^+CD25^+$ درخون محیطی بیماران کرون در مقایسه با گروه کنترل بیش‌تر بود، اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p =۰/۱۳۵۴). هم‌چنین فراوانی سلول‌های $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ (سلول‌های T اجرایی فعال شده) در بیماران کرون نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیش‌تر بود (p =۱/۰۳۰۴). علاوه بر این، فراوانی سلول‌های $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ Treg در خون محیطی بیماران کرون در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کم‌تر بود (p =۰/۰۲۰۶). هم‌چنین یک کاهش معنی‌دار در نسبت سلول‌های Treg به سلول‌های T اجرایی فعال شده (Treg/activated Teff cells) در بیماران کرون در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (p =۰/۰۰۰۱).

بحث

در این مطالعه سلول‌های Treg با استفاده از چهار شاخص CD4، CD25، FoxP3 و CD127 به روش فلوسیتومتری برای اولین بار در کشور مورد ارزیابی قرار گرفت. بیماری کرون مشکل ناتوان کننده ای است که بیش‌تر بالغین جوان را مبتلا می سازد و با وجود این که مرگ در اثر این بیماری امروزه خیلی شایع نیست، اما اختلالات ایجادشده می‌تواند اثری بسیارمخرب بر سلامت، تحصیل، کار و سیر زندگی فرد مبتلا داشته باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که شیوع سرطان کولون و رکتوم در بیماران کرون در حال افزایش است(۳۳،۳۲،۶).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فراوانی سلول‌های $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ Treg در خون محیطی بیماران کرون در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کم‌تر بود. بنابراین اگرچه سلول‌های Treg در خون محیطی بیماران کرون وجود دارند، اما به نظر می‌رسد این بیماران دارای یک نقص عددی (numerical defect) در جمعیت سلول‌های Treg خون محیطی می‌باشند. هم‌چنین نتایج نشان داد که فراوانی سلول‌های $CD4^+CD25^+$ T فاقد شاخص FoxP3 (سلول‌های T اجرایی فعال شده) در بیماران کرون به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود. علاوه بر این، یک کاهش معنی‌دار در نسبت سلول‌های Treg به سلول‌های T اجرایی فعال شده (Treg/activated Teff cells) در بیماران کرون مشاهده شد (p=۰/۰۰۰۱)؛ لذا می‌توان نتیجه گرفت که در خون محیطی بیماران کرون علاوه بر کاهش تعداد سلول‌های Treg، تعادل بین سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های T اجرایی فعال شده نیز مختل می‌باشد.

مطالعات متعددی به بررسی حضور و ویژگی‌های عملکردی سلول‌های Treg در خون محیطی و بافت‌های مخاطی ملتهب بیماران مبتلا به بیماری‌های التهابی روده

به خصوص بیماران کرون پرداختند. Jochen Maul و همکارانش (۲۰۰۵) نشان دادند که فراوانی سلول‌های $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg در خون محیطی بیماران مبتلا به بیماری کرون در طی فاز بهبودی (remission phase) افزایش می‌یابد، اما در خلال بیماری فعال کاهش پیدا می‌کند. علاوه بر این، مخاط ملتهب بیماران حاوی تعداد افزایش یافته ای از سلول‌های Treg و رونوشت‌های FoxP3 در مقایسه با مخاط غیر ملتهب بود. آن‌ها نتیجه گرفتند که فراوانی سلول‌های Treg با فعالیت بیماری کرون (بیماری فعال و غیر فعال) تغییر می‌کند(۳۴). بر اساس مطالعه Nicola Eastaff-Leung و همکارانش (۲۰۱۰)، کاهش فراوانی سلول‌های Treg و افزایش فراوانی سلول‌های Th17 در خون محیطی بیماران کرون مشاهده شد. آن‌ها نتیجه گرفتند که بیماری کرون با یک نسبت کاهش یافته سلول‌های Treg به Th17 (Treg/Th17) در خون محیطی مرتبط می‌باشد(۹). مطالعه انجام شده در کشور ژاپن بر روی بیماران مبتلا به IBD نشان داد که فراوانی سلول‌های $CD4^+CD45RO^+CD25^+$ Treg در خون محیطی بیماران مبتلا به کرون فعال نسبت به گروه کنترل یا بیماری غیر فعال بیش‌تر بوده است(۳۵). این مطالعه از معدود مطالعاتی می‌باشد که بر خلاف مطالعه حاضر و بسیاری از مطالعات دیگر، تعداد سلول‌های Treg در خون محیطی بیماران کرون افزایش داشته است که از علل تفاوت نتایج به دست آمده ممکن است روش متفاوت ارزیابی سلول‌های Treg با استفاده از شاخص‌های CD4، CD25 و CD45RO باشد. در اکثر مطالعات صورت گرفته در بیماران مبتلا به IBD، بیماران بر اساس فعالیت بیماری (Disease Activity) به دو گروه فعال و غیرفعال تقسیم شده‌اند. در اغلب این مطالعات، کاهش فراوانی سلول‌های Treg در خون محیطی بیماران مبتلا به IBD فعال مشاهده شده است(۳۷،۳۶،۳۴). با توجه به این‌که در این مطالعه همه بیماران در شروع بیماری بوده (new case) و به علت وخامت بیماری به پزشک مراجعه کرده بودند و تا قبل از نمونه‌گیری هیچ درمانی را دریافت نکرده بودند، احتمالاً در فاز فعال بیماری (active disease) قرار داشته‌اند.

در برخی از مطالعات انجام شده در بیماران مبتلا به IBD و سایر بیماری‌های اتوایمیون، اغلب بیماران داروهایی از قبیل Mesalazine، 6-Mercaptopurine، Steroids، Azathioprine و حتی Infliximab مصرف می‌کردند که این امر می‌تواند بر نتیجه مطالعات و داده‌های به دست آمده تاثیر بگذارد(۴۰،۹-۳۸). در همین راستا چندین مطالعه نشان دادند که درمان بیماران مبتلا به IBD و آرتریت روماتوئید با داروی بیولوژیک infliximab، فراوانی سلول‌های Treg را در خون محیطی افزایش می‌دهد(۴۳،۳۷-۴۱). اما در مطالعه حاضر، بیماران هیچ دارویی تا قبل از نمونه‌گیری مصرف نکرده بودند که سبب تمایز این مطالعه از سایر مطالعات می‌گردد.

با توجه به این که در این تحقیق، کاهش فراوانی سلول‌های Tregدر خون محیطی و از طرفی در بسیاری از مطالعات، افزایش فراوانی این سلول‌ها در بافت‌های مخاطی ملتهب و درگیر گزارش شده است، این احتمال وجود دارد که سلول‌های Treg از خون محیطی به بافت‌های مخاطی ملتهب به منظور کنترل التهاب و بازگرداندن هومئوستاز مخاطی در حال آمد و شد باشند. در تایید این فرضیه Nathalie Holmen و همکارانش مشاهده کردند که پذیرنده‌های سلول T (TCR) در سلول‌های Treg جدا شده از خون محیطی و بافت مخاطی بیماران مبتلا به بیماری‌های التهابی روده، دارای گنجینه‌های پذیرنده Vβ پلی کلونال مشابه (polyclonal Vβ T cell receptor repertoires) می‌باشند(۳۶). این نشان می دهد که افزایش سلول های Treg در بافت‌های مخاطی ملتهب بیماران مبتلا به IBD ممکن است ناشی از مهاجرت و به کارگیری این سلول‌ها از خون محیطی به بافت‌های مخاطی باشد که البته به بررسی‌های بیش‌تر و جامع تری به منظور پی‌بردن به منشاء سلول‌های Treg مخاطی نیاز می‌باشد. در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیماری کرون با یک کاهش پیشرونده ای در ذخیره سلول‌های

Treg خون محیطی مرتبط می‌باشد. علاوه بر این، نسبت سلول‌های T اجرایی فعال شده به سلول‌های Treg در این بیماران افزایش می‌یابد و لذا تعادل بین سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های T اجرایی فعال شده در این بیماران مختل می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که شناخت مکانیسم‌های افزایش سلول‌های Treg و نقش موثر این سلول‌ها در بهبود وضعیت بیماران کرون، یکی از راه‌کارهای درمانی موثر در این بیماران می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی آقای علی خلیلی به شماره (۱۵۳۵-۹۱) می‌باشد که با مساعدت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است که بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از آن معاونت اعلام می‌دارند.

References

1. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. Inflamm Bowel Dis 2006; 12(Suppl 1): S3-9.
2. Johnston RD, Logan RF. What is the peak age for onset of IBD? Inflamm Bowel Dis. 2008; 14 (Suppl 2) : S4-5.
3. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 2008; 8(6): 458-466.
4. Aghazadeh R, Zali MR, Bahari A, Amin K, Ghahghaie F, Firouzi F. Inflammatory bowel disease in Iran: a review of 457 cases. J Gastroenterol Hepatol 2005; 20(11): 1691-1695.
5. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 2002; 347(6): 417-429.
6. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol 2003; 3(7): 521-533.
7. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. World J Gastroenterol (WJG) 2014; 20(1): 91-99.
8. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2003; 124(2): 521-536.
9. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. J Clin Immunol 2010; 30(1): 80-89.
10. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol 1995; 102(3): 448-455.
11. Knoflach P, Park BH, Cunningham R, Weiser MM, Albini B. Serum antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterology 1987; 92(2): 479-485.
12. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995; 155(3): 1151-1164.
13. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. Current opinion in immunology. 2002; 14(6): 771-778.

14. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. Nat Immunol. 2007; 8(5): 457-462.
15. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 2003; 4(4): 330-336.
16. Shobeiri S, Mohammadnia Afrozi M, Jafari N, Abediankenari S. Regulatory T Cells: Types, Generation and Function. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(117): 225-246 (Persian) .
17. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. J Exp Med 2002; 196(10): 1335-1346.
18. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. Int Immunol 2007; 19(4): 345-354.
19. Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Verhasselt B, Vandekerckhove B. Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. Blood 1996; 88(11): 4239-4245.
20. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. J Immunol Methods 2007; 319(1-2): 41-52.
21. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med 2006; 203(7): 1701-1711.
22. Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. Nat Immunol 2005; 6(4): 338-344.
23. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol 2008; 8(7): 523-532.
24. Abediankenari S, Farzad F, Rahmani Z, Hashemi-Soteh MB. HLA-G5 and G7 Isoforms in Pregnant Women. Iran J Allergy Asthma Immunol 2015; 14(2): 217-221.
25. Faramarz F, Abediankenari S, Rahmani Z, Hashemi-Soteh MB, Hosseinikhah Z, Naghavian E. The role of HLA-G4 and G5 in threatened-abortion women. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(106): 2-10 (Persian) .
26. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. Int Immunol 1993; 5(11): 1461-1471.
27. Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL. Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. J Exp Med 1994; 179(2): 589-600.
28. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol 2003; 170(8): 3939-3943.
29. Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. Curr Opin Pediatr 2001; 13(6): 533-538.
30. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy,

enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nature Genetics 2001; 27(1): 20-21.

31. Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. J Allergy Clin Immunol 2007; 120(4): 744-750.
32. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18 (Suppl 2): 1-5.
33. Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, Stokkers PC, van der Woude CJ, Hommes DW, et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. Gut 2008; 57(9): 1246-1251.
34. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2005; 128(7): 1868-1878.
35. Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, et al. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. Dig Dis Sci 2006; 51(4): 677-686.
36. Holmen N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, Sjovall H, et al. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. Inflamm Bowel Dis 2006; 12(6): 447-456.
37. Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourie B, Kaiserlian D. Therapy with anti-TNFalpha antibody enhances number and function of Foxp3(+) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis 2011; 17(1): 160-170.
38. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, et al. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. J Immunol 2004; 173(5): 3119-3130.
39. Kelsen J, Agnholt J, Hoffmann HJ, Romer JL, Hvas CL, Dahlerup JF. FoxP3(+)CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. Clin Experim Immunol 2005; 141(3): 549-557.
40. Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, et al. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. Clin Immunol 2007; 125(3): 281-290.
41. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. J Exp Med 2007; 204(1): 33-39.
42. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. J Exp Med 2004; 200(3): 277-285.
43. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quaratino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. Immunology 2008; 125(2): 178-183.