

عملکرد و فنوتیپ لنفوسیتی بافت آپاندیس سالم و حاد در بیماران مبتلا به آپاندیسیت

شعبانعلی علیزاده^۱، قاسم مسیبی^{۲*}، علی قضاوی^۳، مهسا اخوت^۴ M.S.

- ۱- گروه جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
 ۲- گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
 ۳- دانشجویی دکترای ایمونولوژی، گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
 ۴- کارشناس، گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: ghasemmosayebi@arakum.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲

چکیده

هدف: التهاب آپاندیس (آپاندیسیت) یکی از شایع ترین بیماری‌های التهابی شکمی است. عمل کرد بافت آپاندیس بخوبی مشخص نیست. در این مطالعه جهت درک بهتر عملکرد ایمونولوژیک آپاندیس، الگوی فنوتیپیک و عمل کردی زیر دسته های لنفوسیتی در بافت آپاندیس بیماران مبتلا به آپاندیسیت و افراد سالم مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های بافتی و سلول‌های تک هسته‌ای آپاندیس از ۸۱ بیمار (با میانگین سنی $23 \pm 10/5$) که از نظر کلینیکی به آپاندیسیت مشکوک بوده و تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، جمع آوری گردید. بر اساس آزمایشات هیستوپاتولوژیک، ۲۵ بیمار دارای آپاندیس نرمال در حالی که ۴۰ بیمار دارای آپاندیسیت ساپوراتیو و ۱۶ بیمار دارای فرم گانگرنه بودند. خصوصیات فنوتیپی زیر دسته‌ای لنفوسیتی در بافت با روش فلوسیتومتری سه رنگ مورد آنالیز قرار گرفت. پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته ای بافت آپاندیس نیز با روش MTT سنجیده شد.

نتایج: در بین گروه‌های مورد مطالعه فراوانی سلول‌های CD19/DR, HLA-DR, CD19 در بافت آپاندیس بیماران مبتلا به فرم حاد آپاندیسیت (ساپوراتیو) در مقایسه با افراد واجد آپاندیس نرمال یا بیماران مبتلا به فرم گانگرنه به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0/01$). در بین گروه‌های مورد مطالعه میزان پاسخ تکثیری سلول‌های بافت آپاندیس فرم ساپوراتیو به میتوزن‌های PHA و LPS در مقایسه با گروه‌های دیگر بیشتر بود ($p < 0/01$).

نتیجه گیری: فنوتیپ و عملکرد لنفوسیت‌ها در بافت آپاندیس نرمال با آپاندیس ملتهب متفاوت است. این نتایج نشان می‌دهد که بافت آپاندیس با پروفیل لنفوسیتی ویژه ممکن است در جلوگیری از برخی عفونت‌های روده‌ای موثر باشد.

واژگان کلیدی: آپاندیس، آپاندیسیت، فنوتیپ، لنفوسیت، تکثیر، فلوسیتومتری

مقدمه

آپاندیس در قسمت انتهایی سکوم در هفته هشتم رویانی ظاهر می‌گردد. آپاندیس دارای منشا مشترک با ایلئوم و کولون بوده و بعد از تولد به علت رشد بیشتر سکوم به طرف داخل سمت دریچه ایلئوسکال جابجا می‌گردد. طول آپاندیس می‌تواند کمتر از یک سانتی‌متر تا بیش از ۳۰ سانتی‌متر متغیر باشد. طول اکثر آپاندیس‌ها بین ۶ تا ۹ سانتی‌متر متغیر است (۱).

آپاندیسیت یکی از شایعترین علل حاد اندپکاسیون‌های جراحی شکم در سراسر جهان است. آپاندیسیت عمدتاً در دهه دوم و سوم زندگی رخ می‌دهد. شیوع آن بین سنین ۱۰ تا ۱۹ سال در بالاترین حد است و در این سنین ۲۳۳ نفر به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ هزار مبتلا به آپاندیسیت می‌شوند (۲). هنوز علت روشنی برای آپاندیسیت بیان نشده است. برخلاف گذشته که آپاندیس یک عضو زاید و بدون عملکرد مشخص در نظر گرفته می‌شد، امروزه یک عضو ایمونولوژیک می‌باشد که به عنوان یک بافت لنفوئیدی ثانویه وابسته به گوارش محسوب می‌شود (۳). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که ارتباط بالقوه‌ای بین آپاندکتومی و کاهش ایجاد بیماری التهابی روده از جمله کولیت اولسراتیو وجود دارد (۴ و ۵). Jo و همکاران (۴) با بررسی خصوصیات ایمونولوژیک و هیستولوژیک آپاندیس در بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو نشان دادند که لنفوسیت‌های موجود در بافت آپاندیس در فازی از فعال شدن وجود دارند که این امر زمینه را برای ایجاد التهاب روده فراهم می‌کند. به هر حال هنوز نقش آپاندیس و بیماری‌های التهاب روده مشخص نشده است و لازم است مطالعات اپیدمیولوژیک و ایمونولوژیک بر روی فنوتیپ لنفوسیت‌های موجود در این بافت صورت گیرد. در مطالعه حاضر به بررسی عملکرد و فنوتیپ لنفوسیت‌های موجود در بافت آپاندیس سالم و آپاندیس ملتهب پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی (مورد-شاهدی) ۸۱ بیمار که با تشخیص آپاندیسیت تحت عمل آپاندکتومی قرار گرفتند مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. تمامی بیماران توسط متخصص جراحی معاینه و در پرسشنامه اطلاعات بیماران ثبت شد. معیار ورود به مطالعه: بیماران با شکم حاد که مشکوک به آپاندیسیت بود. بیمارانی که خود تمایل به شرکت نداشتند و بیمارانی که دارای سابقه

جراحی شکمی یا مبتلا به بیماری‌های عفونی و التهابی و یا سرطان بودند وارد مطالعه نشدند. از تمامی بیماران شرکت کننده در طرح رضایت نامه اخلاقی کتبی گرفته شد. انجام این تحقیق با کد اخلاقی ۲-۸۷-۸۹ مورد تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک قرار گرفت.

تهیه سلول‌های تک هسته‌ای از بافت آپاندیس: بیماران بر اساس پروتکل‌های درمانی تحت عمل جراحی قرار گرفتند. بلافاصله بافت در اتاق عمل در شرایط استریل به طور طولی برش داده شد و نیمی از آن جهت تشخیص نوع آپاندیسیت به پاتولوژیست ارسال گردید. بر اساس تشخیص پاتولوژیست نوع آپاندیس به سه گروه آپاندیس سالم (نرمال)، آپاندیسیت حاد و گانگرنه طبقه بندی گردید. نیم دیگر در بافر فسفات استریل غوطه ور و به آزمایشگاه منتقل شد. بافت آپاندیس در یک پلیت شیشه ای ۳۰ میلی‌لیتر استریل حاوی محیط کشت RPMI-1640 توسط تیغ جراحی یا قیچی تیز به قطعات ریز تبدیل شد. به منظور جداسازی قطعات بافتی هضم نشده، سوسپانسیون سلولی از یک توری سیمی بسیار ریز عبور داده شد. سوسپانسیون سلولی دو تا سه بار با محیط کشت بدون سرم جنین گوساله (FCS) به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰-۳۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد شسته شد. رسوب سلولی بدست آمده در ۴ تا ۵ میلی‌لیتر محیط کشت بدون FCS حاوی ۵ میلی‌مولار EDTA (به منظور جلوگیری از اتصال سلول‌ها به یکدیگر و تشکیل کلامپ سلولی) مخلوط گردید. سوسپانسیون سلولی به آرامی بر روی ۲ تا ۳ میلی‌لیتر محیط گرادیان فایکول قرار داده شد. مجموعه فوق به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۰۰g و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، سلول‌های با وزن حجمی بالا (high density) که غالباً شامل گلبول‌های قرمز بودند در کف لوله رسوب کردند. سلول‌های کم چگال (low density) شامل لنفوسیت و منوسیت در فاز بین محیط کشت و محیط گرادیان (interface) باقی ماندند. سلول‌های بین فازی توسط پیپت پاستور از روی محیط گرادیان جمع آوری و در داخل یک لوله فالکون تمیز ریخته شد. سلول‌ها ۲ تا ۳ بار با محیط کشت بدون FCS به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰-۳۵۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شسته شدند. سلول‌های تک هسته‌ای بدست آمده در این مرحله جهت سنجش پاسخ تکثیری و فلوسیتومتری مورد استفاده قرار گرفتند.

بادی‌های منوکلونال ضد مارکرهای CD3, CD4, CD8, CD19, CD5, HLA-DR (شرکت Bioscience - آمریکا) اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه‌ها دو بار با بافر فسفات شستشو داده شده و بلافاصله توسط دستگاه فلوسیتومتری سه رنگ (BD-FACSCalibur™, USA) از نظر مارکرهای سطحی مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: اطلاعات به دست آمده از پرسشنامه‌ها و نتایج آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزار SPSS و روش‌های آماری مناسب مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت توزیع نرمال بودن داده‌ها از آزمون کای-دو استفاده شد. جهت مقایسه میانگین متغیرها در بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون T-test استفاده شد. سطح معنی‌داری با $(p < 0.05)$ در نظر گرفته شد.

نتایج

مشخصات دموگرافیک گروه‌های مورد مطالعه

مشخصات بیماران مورد مطالعه بر اساس اشکال آپاندیسیت و توزیع جنس در گروه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: توزیع سنی در گروه‌های مورد مطالعه

اشکال آپاندیس	مرد	زن	تعداد
نرمال	۱۰	۱۵	۲۵
ساپوراتیو	۲۱	۱۹	۴۰
گانگرنه	۱۰	۶	۱۶

با بررسی درصد گلبول‌های سفید و همچنین درصد نوتروفیل، لنفوسیت و ائوزینوفیل در بین گروه‌های مورد مطالعه مشخص گردید که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد (جدول ۲).

جدول ۲: میانگین سنی و درصد لکوسیتی در خون محیطی تمامی بیماران مورد مطالعه.

*N.S: Not significant, **:Std. Deviation

نوع آپاندیس	سن	گلبول سفید	نوتروفیل	لنفوسیت	ائوزینوفیل	
Normal	Mean	20.1667	14.0778	78.1667	25.0000	2.1667
	S.D**	9.48218	3.56545	6.38242	38.56088	1.29479
Suppurative	Mean	22.8000	12.0867	79.4333	15.6667	1.7333
	S.D	10.35041	3.25722	9.08460	8.07864	0.82768
Gangrene	Mean	27.0909	15.1636	79.4545	16.3636	1.2727
	S.D	12.55750	3.79533	6.75816	5.74931	0.46710
p. value	N.S*	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

بررسی پاسخ تکثیر: به منظور بررسی میزان تکثیر سلولی، سلول‌های تک هسته‌ای بدست آمده از بافت آپاندیس در مرحله قبلی یک سوسپانسیون با غلظت $10^6 \times 1/5$ سلول بر میلی‌لیتر در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FCS تهیه شد. میزان تکثیر سلولی، در پلیت‌های میکروتیتراسیون ۹۶ خانه به وسیله سنجش MTT ارزیابی شد. در هر حفره از پلیت ۹۶ حفره‌ای، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی فوق به صورت سه تایی (triplicate) ریخته شد و رقت‌های ۲۰۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰۰، ۵۰۰۰۰۰، ۲۵۰۰۰۰ و ۱۲۵۰۰۰ سلولی تهیه شد. به تمام حفره‌ها بجز کنترل مقدار ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر فیتوهماگلوتنین-آ (PHA) و یا لیپو پلی‌ساکارید (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و میکروپلیت‌ها در انکوباتور کشت سلول انکوبه گردیدند. بعد از ۷۲ ساعت ۱۰ میکرولیتر MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2)-2,5diphenyl tetrazolium) به غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Sigma-Aldrich, USA) به تمام حفره‌ها اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور کشت سلول انکوبه گردیدند (محللول استوک MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS با pH حدود ۶/۸ تهیه شد و در ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و دور از نور نگهداری شد). سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول SDS-HCl، به عنوان حلال کریستال‌های ارغوانی فورمازان، به حفره‌ها اضافه و با سمپلر به خوبی مخلوط شد و بعد از ۳۰ دقیقه در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس رنگ حاصل در ۵۴۵ نانومتر قرائت شد.

بررسی مارکرهای سطحی با روش فلوسیتومتری: در این مطالعه از روش فلوسیتومتری مستقیم و چند رنگ (سه رنگ) جهت بررسی مارکرهای سطحی استفاده شد. سلول‌های تک هسته‌ای بدست آمده از بافت آپاندیس با غلظت یک میلیون سلول در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین تهیه شد. جهت تعیین هر یک از مارکرها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در لوله‌های مربوطه ریخته شد و مقدار ۱ تا ۵ میکرولیتر از آنتی

بود (جدول ۳)

بررسی فنوتیپی سلول‌های بافت آپاندیس در دو گروه نرمال و ساپوراتیو نشان از کاهش معنی دار ($p < 0.05$) سلول‌های CD3/CD4 در بافت آپاندیسیت فرم ساپوراتیو در مقایسه با نرمال داشت. آنالیز آماری نشان داد که بین فنوتیپ سلولی در بافت آپاندیس سالم و گانگرن تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۳).

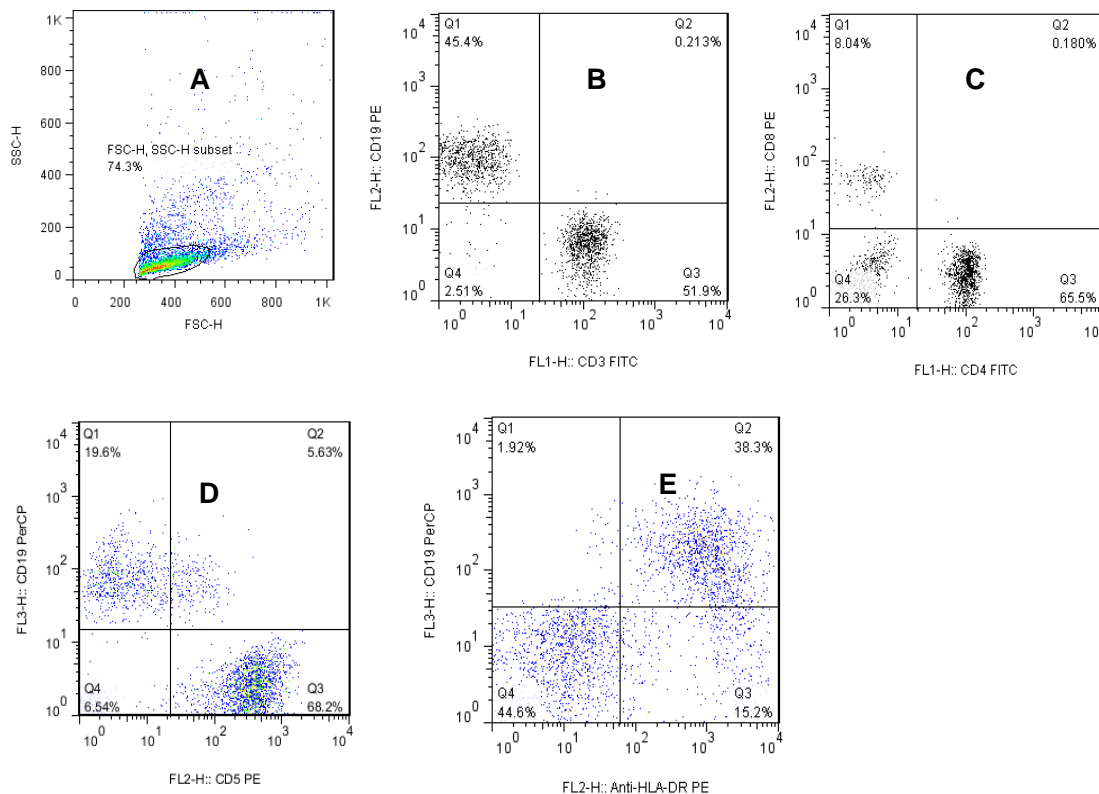
مقایسه تکثیر سلولی در خون محیطی و بافت آپاندیس

نتایج بررسی میزان تکثیر سلولی تحریک شده با فیتوهماگلوترین (PHA) نشان داد که میزان تکثیر سلولی در فرم ساپوراتیو تفاوت معنی داری ($p = 0.02$) با سایر گروه‌ها داشت. همچنین میزان تکثیر سلولی تحریک شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) نشان داد که میزان تکثیر سلولی در آپاندیس ساپوراتیو تفاوت معنی داری ($p = 0.12$) در میزان تکثیر سلولی با سایر گروه‌ها مشاهده شد (نمودار ۲).

بررسی مارکرهای سطحی در بافت آپاندیس

نتایج حاصل از بررسی مارکرهای سطحی با روش فلوسیتومتری در بافت آپاندیس نشان داد که ۴۰ تا ۵۰ درصد لنفوسیت‌ها دارای مارکر CD19 بودند (نمودار ۱). با مقایسه بین اشکال مختلف آپاندیس مشخص شد که تفاوت معنی داری ($p < 0.01$) در درصد سلول‌های CD19 بین گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت از نظر آماری درصد سلول‌های CD19 بین گروه دارای آپاندیس سالم در مقایسه با گروه واجد آپاندیسیت حاد کمتر بود. در حالی که تفاوتی معنی داری در درصد سلول‌های CD3 بین گروه‌ها وجود نداشت. همچنین تفاوت معنی داری ($p < 0.01$) در درصد سلول‌های CD19/HLA-DR در بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ۳).

نتایج نشان داد که در آپاندیسیت ساپوراتیو درصد سلول‌های واجد مارکرهای CD19 و HLA-DR در مقایسه با فرم گانگرنه بیشتر بود. در حالی که در فرم گانگرنه درصد سلول‌های با فنوتیپ CD3/CD4 بطور معنی داری بیشتر از فرم ساپوراتیو

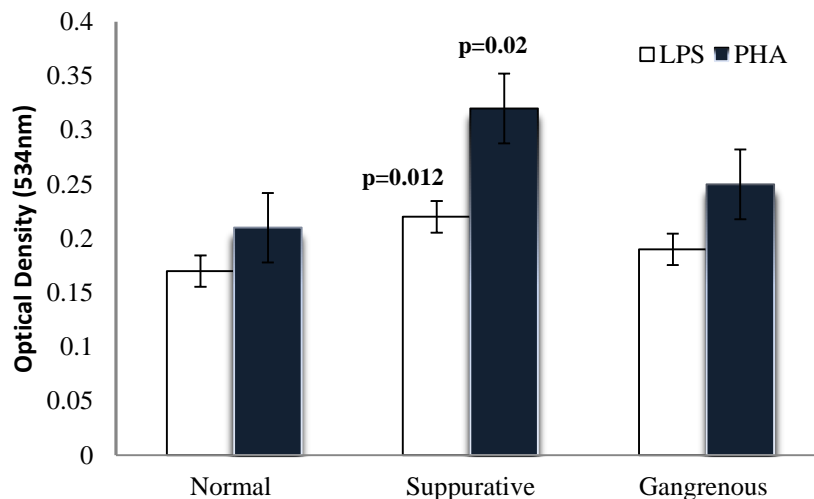


نمودار ۱: نتایج فلوسیتومتری سه رنگ زیر دست‌های لنفوسیتی در بافت آپاندیس نرمال: نتایج نشان داد که درصد زیادی از سلول‌های بافت آپاندیس (۷۴/۳٪) از نوع لنفوسیت بوده (A)، همچنین درصد لنفوسیت‌های B و T نزدیک به هم می‌باشند (B). مقایسه زیر دسته‌های لنفوسیت T نشان داد که حدود ۶۵ درصد $CD4^+$ و حدود ۸ درصد $CD8^+$ هستند (C). حدود ۵ تا ۶ درصد از لنفوسیت‌های B مستقر در بافت آپاندیس از نوع (D) B1 ($CD5^+$ + B cell) و غالب لنفوسیت‌ها B مولکول‌های HLA-DR را در سطح خود بیان می‌کنند (E).

جدول ۳: مقایسه میانگین درصد زیر جمعیت‌های لنفوسیتی در بیماران مبتلا به آپاندیسیت و افراد دارای آپاندیس نرمال. اعداد بصورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است.

CD markers	Appendix tissue		
	Normal	Suppurative	Gangrene
CD3	51.65 \pm 11.68	46.50 \pm 13.85	54.25 \pm 7.81
CD4	43.76 \pm 10.01	36.53 \pm 12.67	44.06 \pm 11.58
CD8	8.75 \pm 4.77	10.68 \pm 9.42	7.75 \pm 1.84
CD5	53.04 \pm 12.42	41.28 \pm 17.92	52.33 \pm 13.88
CD19	37.40 \pm 16.42	43.00 \pm 14.87*	30.62 \pm 13.60
CD19/CD5	5.83 \pm 1.88	5.85 \pm 2.78	5.18 \pm 1.12
DR	41.45 \pm 15.33	46.94 \pm 15.19	35.62 \pm 7.19
CD19/HLA-DR	27.50 \pm 15.51	34.43 \pm 16.22**	29.62 \pm 7.96

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل



نمودار ۲: مقایسه پاسخ تکثیری سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از بافت آپاندیس در حضور و عدم حضور فیتوهماگلوتنین (PHA) و لیپوپلی ساکارید (LPS). نشان داد که میزان تکثیر سلولی در فرم ساپوراتیو در حضور فیتوهماگلوتنین (PHA) و لیپوپلی ساکارید (LPS) تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت.

Soo و همکاران (۹) نتایج مشابهی را گزارش دادند. همچنین آن‌ها گزارش کردند که درصد لنفوسیت‌های B در بافت آپاندیس نرمال با آپاندیس ملتهب تفاوتی ندارد. در حالی که در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که درصد سلول‌های B در آپاندیسیت ساپوراتیو در مقایسه با فرم گانگرنه و آپاندیس نرمال بیشتر بود. این افزایش در تعداد سلول‌های B در آپاندیس ملتهب (حاد) ممکن است ناشی از فعال شدن و یا ارتشاح این سلول‌ها از خون محیطی به این بافت باشد. در خصوص ارتشاح لنفوسیت‌های B از خون محیطی به بافت آپاندیس شواهد یا عدله اثبات شده‌ای وجود ندارد. لازم است مطالعاتی در این زمینه صورت گیرد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد لنفوسیت‌های B در بافت آپاندیس ۴۰ تا ۵۰ درصد لنفوسیت‌ها را شامل می‌شود. somekh و همکاران (۶) نیز نشان دادند که ۴۸ درصد لنفوسیت‌های موجود در آپاندیس دارای فنوتیپ CD19 می‌باشد. در حالی که در خون محیطی درصد این سلول‌ها بین ۱۵ تا ۲۰ درصد می‌باشد (۷). لنفوسیت‌های B با تولید آنتی‌بادی به عنوان اصلی‌ترین سلول در پاسخ‌های ایمنی هومورال نقش دارند (۸). درصد بالای لنفوسیت‌های B در بافت آپاندیس حاکی از نقش حساس این بافت در دفاع بر علیه عفونت‌های روده‌ای است.

نرمال با آپاندیس ملتهب متفاوت است. این نتایج نشان می‌دهد که بافت آپاندیس با پروفیل لنفوسیتی ویژه ممکن است در جلوگیری از برخی عفونت‌های روده‌ای موثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم آموزش و تحقیقات و مدیریت محترم پژوهش و همکاران محترم حوزه پژوهش و شورای محترم پژوهشی و همه عزیزانی که به نحو مقتضی در پشتیبانی علمی و مالی و اجرایی ما را کمک نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Fisher RE. The primate appendix: a reassessment. *The Anatomical record*. 2000 Dec 15; 261(6): 228-36.
2. de Brito P, Gomez MA, Besson M, Scotto B, et al. [Frequency and epidemiology of primary epiploic appendagitis on CT in adults with abdominal pain]. *Journal de radiologie*. 2008 Feb; 89(2): 235-43.
3. Laurin M, Everett ML, Parker W. The cecal appendix: one more immune component with a function disturbed by post-industrial culture. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011 Apr; 294(4): 567-79.
4. Jo Y, Matsumoto T, Yada S, Nakamura S, et al. Histological and immunological features of appendix in patients with ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*. 2003 Jan; 48(1): 99-108.
5. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *The New England journal of medicine*. 2001 Mar 15; 344(11): 808-14.
6. Somekh E, Serour F, Gorenstein A, Vohl M, et al. Phenotypic pattern of B cells in the appendix: reduced intensity of CD19 expression. *Immunobiology*. 2000 Jan; 201(3-4): 461-9.
7. Barcelo B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, et al. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J*. 2008 Mar; 31(3): 555-62.
8. Pillai S, Mattoo H, Cariappa A. B cells and autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 2011 Dec; 23(6): 721-31.
9. Soo KS, Michie CA, Baker SR, Wyllie JH, et al. Selective recruitment of lymphocyte subsets to the inflamed appendix. *Clinical and experimental immunology*. 1995 Apr; 100(1): 133-8.

لنفوسیت های B به عنوان یک سلول عرضه کننده آنتی ژن نیز عمل می‌کند. این سلول‌های در سطح خود مولکول‌های HLA-DR را بیان می‌کنند. بدنبال فعال شدن لنفوسیت‌های B بیان این مارکر نیز افزایش می‌یابد (۱۰). نتایج مطالعه ما نشان داد درصد سلول‌های واجد HLA-DR در بافت آپاندیس بیماران مبتلا به آپاندیسیت در مقایسه با آپاندیس نرمال بیشتر بود. نتایج حاصل، این تئوری را تقویت می‌کند که در آپاندیس ملتهب یک پاسخ ایمنی رخ داده که سبب افزایش بیان HLA-DR و افزایش تعداد لنفوسیت‌های B می‌شود. نتایج فلوسیتومتری نشان از بیان بیشتر مولکول HLA-DR در سطح لنفوسیت‌های B در افراد مبتلا به آپاندیسیت داشت. این سوال مطرح است که علت فعال شدن لنفوسیتی چیست؟ هر چند علت دقیق آپاندیسیت مشخص نیست ولی برخی مطالعات قبلی نشان می‌دهد که بعضی از عفونت‌ها در ایجاد آپاندیسیت دخالت دارند (۱۱ و ۱۲). افزایش این سلول‌ها ممکن است ناشی از ایجاد یک پاسخ ایمنی موضعی در بافت آپاندیس باشد و این تئوری را تقویت می‌کند که ورود برخی عفونت‌ها به بافت منجر به التهاب آپاندیس می‌شود. جهت توجیح این فرضیه، در این مطالعه میزان تکثیر لنفوسیتی به طور غیر اختصاصی به دو میتوزن فیتوهمگلوتنین A (PHA) و لیپوپلی ساکارید (LPS) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پاسخ تکثیری در لنفوسیت‌های جدا شده از بافت آپاندیس فرم ساپوراتیو در مقایسه با گروه نرمال به PHA و هم به LPS بیشتر بود. این افزایش تکثیر می‌تواند ناشی از یک واکنش ایمنی در بافت آپاندیس این دسته از بیماران باشد. در هر صورت با توجه به ماهیت میتوزن‌ها می‌توان این نتیجه را گرفت که هم ایمنی سلولی در پاسخ به PHA و هم ایمنی هومورال در پاسخ به LPS در بافت آپاندیس ملتهب (ساپوراتیو) افزایش می‌یابد که تا حدودی می‌تواند تاییدی بر این نظریه باشد که برخی از باکتری‌های گرم منفی موجود در دستگاه گوارش و روده‌ها در ایجاد آپاندیسیت دخالت دارند (۱۳ و ۱۴). برای قطعیت این فرضیه پیشنهاد می‌شود که میزان پاسخ تکثیری به طور اختصاصی بر علیه آنتی ژن‌های خاص میکروبی مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه گیری

فنوتیپ و عملکرد لنفوسیت‌ها در بافت آپاندیس متفاوت از خون محیطی است. فنوتیپ و عملکرد لنفوسیت‌ها در بافت آپاندیس

10. Chen X, Jensen PE. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Archivum immunologiae therapiae experimentalis*. 2008 Mar-Apr; 56(2): 77-83.et.
11. Panidis S, Paramythiotis D, Panagiotou D, Batsis G, et al. Acute appendicitis secondary to *Enterobius vermicularis* infection in a middle-aged man: a case report. *Journal of medical case reports*. 2011; 5(1): 559.
12. Alder AC, Fomby TB, Woodward WA, Haley RW, et al. Association of viral infection and appendicitis. *Arch Surg*. 2010 Jan; 145(1): 63-71.
13. Preece ER, Athan E, Watters DA, Gyorki DE. Spontaneous bacterial peritonitis: a rare mimic of acute appendicitis. *ANZ journal of surgery*. 2012 Apr; 82(4): 283-4.
14. Salemis NS. Acute appendicitis presenting with *Klebsiella pneumoniae* septicemia due to bacterial translocation. *The American journal of emergency medicine*. 2009 Oct; 27(8): 1023. e3-4.

Function and Phenotype of Lymphocytes in Normal and Inflamed Appendix in Appendicitis Patients

Alizadeh ShA. Ph.D. ¹, Mosayebi G. Ph.D. ^{2*}, Ghazavi A³, Okhovat M⁴

1. Department of Surgery, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2. Department of Immunology, School of Medicine & Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Ph.D. student of Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4. B.Sc. of Microbiology, Department of Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

* Email corresponding author: gasemmosayebi@arakmu.ac.ir

Received: 22 May. 2012

Accepted: 19 Jun. 2012

Abstract

Aim: Appendicitis is one of the most common abdominal inflammatory diseases. The function of appendix is not clearly defined. In this study to understand the immunological function of the appendix, we investigated the function and phenotypic pattern of lymphocyte in appendix of patients with normal and inflamed appendix tissue.

Material and Methods: Appendix tissue and appendiceal mononuclear cells obtained from 81 patients (mean age; 23 ± 10.5), who was clinically suspected of having appendicitis were collected. Based on histopathological examination, twenty-five patients had normal appendix while 40 and 16 were diagnosed with suppurative and gangrene appendicitis, respectively. The phenotypic characteristics of lymphocyte subsets in appendix was analyzed using three color-flow cytometry. In addition, the proliferative response of tissue mononuclear cells was assayed by MTT method.

Results: A significant difference ($p < 0.01$) was observed in the percentage of CD19/HLA-DR, HLA-DR and CD19 cells from patients suffering from suppurative appendicitis in comparison with the patients having normal appendix or gangrene one. There was also a significant difference ($p < 0.01$) in the proliferative responses of the appendiceal mononuclear cells to PHA and LPS from patients with suppurative appendicitis when compare with other groups.

Conclusion: The phenotypic and function of lymphocytes are different between normal and inflamed appendix tissue. These results showed that the appendix tissue with special lymphocyte profile may be effective in preventing or reducing intestinal infections.

Key words: Appendix, Appendicitis, Phenotype, Lymphocytes, Proliferation, Flow cytometry