

بررسی کمی تغییرات بیان ژن T-Bet در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن

فاطمه گنجعلی^۱، محمد رستمی نژاد^۲، حمید اسدزاده عقدائی^۲، مهرداد هاشمی^{۳،۴}

۱. گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی

شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات علوم همگرای پزشکی فرهیختگان، بیمارستان فرهیختگان، دانشگاه آزاد اسلامی علوم

پزشکی تهران، ایران

۴. گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،

ایران

نویسنده مسئول:

مهرداد هاشمی

گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: بر اساس مطالعات صورت گرفته، فاکتور رونویسی T-bet می تواند با افزایش پاسخ های با واسطه Th1 و تولید سایتوکاین های پیش التهابی مانند اینترفرون گاما ($IFN\gamma$) و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا ($TNF-\alpha$)، بر پیشرفت التهاب و وخیم تر شدن بیماری سلیاک موثر باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن T-bet در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن به مدت ۶ ماه یا بیشتر در مقایسه با افراد سالم بود.

روش کار: در این مطالعه ابتدا تعداد ۲۰ نمونه خون محیطی از بیماران مبتلا به بیماری سلیاک و ۲۰ نمونه از افراد سالم به عنوان گروه کنترل جمع آوری شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، جفت پرایمر اختصاصی ژن T-bet طراحی و پس از تایید با نرم افزار بلاست، مورد استفاده قرار گرفت. PCR انجام گردید و سپس بررسی بیان ژن T-bet با روش Real-time PCR صورت گرفت.

یافته ها: در این مطالعه تعداد ۱۲ نفر (۶۰٪) زن و ۸ نفر (۴۰٪) مرد در گروه بیمار ($37,05 \pm 16,07$) و تعداد ۱۳ نفر (۶۵٪) زن و ۷ نفر (۳۵٪) مرد در گروه کنترل ($36,47 \pm 8,62$) بررسی شدند. بیان ژن T-bet در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم فاقد گلوتن برای ۶ ماه یا بیشتر در مقایسه با افراد سالم اختلاف معناداری نشان نداد (Pvalue: ۰,۲۷).

نتیجه گیری: نتایج بررسی کمی تغییر بیان این ژن در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان با رژیم غذایی فاقد گلوتن (برای ۶ ماه یا بیشتر) در مقایسه با افراد کنترل نشان داد که نمیتوان از این ژن به عنوان بیومارکر تشخیصی جهت افتراق این گروه از بیماران از افراد سالم استفاده نمود.

واژگان کلیدی: سلیاک، T-bet، رژیم فاقد گلوتن، پرایمر، PCR

بیماری سلیاک (CD) که به نام های اسپرووی سلیاک و آنتروپاتی حساس به گلوتن (GSE) نیز نامیده می شود، یک بیماری خودایمن مزمن گوارشی است. در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد بروز بیماری سلیاک هستند، مصرف گلوتن^۳ که بخشی از ساختمان بسیاری از غلات مانند گندم، جو و چاودار است سبب بروز پاسخ های ایمنی نامناسب و آسیب مخاط روده می شود. در این بیماری پرزهای روده ای از بین رفته و قابلیت جذبی روده کاهش می یابد، در نتیجه بدن نمی تواند مواد مغذی مورد نیاز را دریافت کند و بیمار در اثر سوءجذب دچار کاهش وزن و اختلالات رشدی و گوارشی می گردد (1-4).

در پاتوژنز بیماری سلیاک عوامل مختلفی از جمله گلوتن، ژنتیک و عوامل محیطی نقش دارند. سلول های Th1 از رده ی سلول های T CD4+ اجرایی هستند که در پاسخ های ایمنی سلولی نقش داشته و با تولید فاکتور های پیش التهابی مانند اینترفرون گاما^۵ (IFN γ) و فاکتور نکروز دهنده تومور بتا^۶ (TNF β)، سبب افزایش التهاب و پیشرفت بیماری سلیاک می شوند (3,5-7). ژن T-bet که با نام دیگر TBX21 هم شناخته می شود، عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی T-box بوده و بسیار محافظت شده است. T-bet در بسیاری از سلول های سیستم ایمنی اکتسابی و ذاتی نقش مهمی داشته و از تنظیم کننده های اصلی تمایز سلول های T کمکی نوع اول (Th1) از سلول های T اولیه است (2,8,9).

هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن T-bet در نمونه های خونی بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی بدون گلوتن در مقایسه با افراد سالم بود (7,10).

^۱ Celiac disease
^۲ Gluten-sensitive enteropathy
^۳ Gluten
^۴ Thelper 1
^۵ Interferon gamma
^۶ Tumor necrosis factor alpha

مواد و روش ها:

جمع آوری نمونه:

در این مطالعه مورد-شاهدی که به منظور بررسی تفاوت‌های بین دو گروه بیمار و کنترل انجام شد، جامعه مورد بررسی شامل ۲۰ فرد سالم (گروه کنترل) و ۲۰ بیمار مبتلا به بیماری سلیاک که تحت رژیم غذایی بودند (برای مدت حداقل ۶ ماه) و جهت درمان یا تشخیص به کلینیک بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان طالقانی مراجعه کرده بودند، بود. معیار ورود نمونه‌ها به مطالعه در گروه بیماران شامل افرادی است که آزمایشات اندوسکوپی و سرولوژیکی آن‌ها (tTG IgA, Anti EMA) برای بیماری سلیاک مثبت گزارش شد و سابقه ابتلا به انواع بیماری‌های خود ایمنی دیگر را نداشتند. معیار های ورود برای گروه کنترل نیز شامل افرادی بود که سابقه ابتلا به بیماری سلیاک در خود و یا خویشاوندانشان دیده نشد. فاکتورهای خروج برای هر دو گروه شامل حاملگی و ابتلا به هرگونه بیماری التهابی و خود ایمنی، بیماری‌های خونی، سرطان کولورکتال، و عفونت دستگاه گوارش در نظر گرفته شد.

از افراد شرکت کننده توسط پزشک متخصص حدود ۱۰-۸ سی سی خون محیطی گرفته شد و در لوله حاوی ضد انعقاد جمع آوری و پرسشنامه نیز توسط محقق تکمیل گردید. از کلیه افراد وارد شده به مطالعه رضایت نامه آگاهانه کتبی با مجوز کمیته اخلاق پژوهش‌کنده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دریافت گردید (کد اخلاق IR.SBMU.RIGLD.REC.1399.035).

Tissue transglutaminase ^Y
Endomysial antibodies [^]

استخراج RNA از خون تازه و سنتز cDNA:

در این مطالعه برای استخراج RNA از کیت YTA Total RNA Purification Mini Kit یکتا تجهیز (تایوان) استفاده شد و تمامی مراحل استخراج طبق پروتکل درج شده در کیت انجام شد. RNA های به دست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده توسط الکتروفورز (روی ژل آگارز ۱,۵ %) و اسپکتروفتومتر صورت گرفت. سپس RNA استخراج شده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. جهت سنتز cDNA از کیت شرکت بایوفکت (2 step 2x RT- PCR Pre- mix Taq, Korea) استفاده گردید و cDNA ها با استفاده از پرایمر اولیگو (dT) و طبق دستورالعمل کیت از روی نمونه های RNA استخراج شده ساخته شدند. میکروتیوب های آماده شده با برنامه دمایی 25 درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (۰)، 50 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه (نسخه برداری معکوس) و ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه (افزایش نهایی طول زنجیر) در دستگاه PCR قرار داده شدند. در نهایت cDNA های تهیه شده در فریزر ۷۰- درجه تا انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند.

طراحی پرایمر

پس از ساخت cDNA، طراحی پرایمرهای ژن مورد نظر (T-bet) و هم چنین ژن مرجع β act انجام شد. توالی ژن های مذکور از پایگاه اینترنتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> دریافت و به کمک نرم افزار Gene Runner پرایمرها برای توالی های مورد نظر طراحی شدند. پس از طراحی، با استفاده از نرم افزار NCBI/Primer-BLAST پرایمرها از نظر توالی و اتصال اختصاصی به ژن هدف مورد بررسی قرار گرفتند. توالی ها و ویژگی های پرایمرهای طراحی شده در جدول 1 آورده شده است.

جدول ۲: توالی و مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	درصد GC%	دمای ذوب °C
T-bet (F)	GTAGTTGGTTGGGGAAGTGG	۲۰	۵۵,۰۰	۵۸,۰۹
T-bet (R)	CTCTCAGGTTTCATCGTGGG	۲۰	۵۵,۰۰	۵۷,۹۸
β act (F)	ATGTGGCCGAGGACTTTGATT	۲۱	۴۷/۶۲	۵۷/۸۷
β act (R)	AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG	۲۱	۵۹/۳۸	۵۹/۸۲

واکنش زنجیره پلی مرز (PCR):

واکنش PCR برای ژن T-bet با استفاده از کیت PCR Mastermix ,Yekta Tajhiz Azma, PCR Taiwan, YTA یکتا تجهیز آزما (تایوان) صورت گرفت.

در ابتدا به روش گرادیانت PCR برای پرایمر چندین دمای مختلف در بازه دمایی ۶۰-۵۷ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد و سپس با استفاده از کیت مخلوط واکنش تهیه گردید. برای تهیه مخلوط PCR با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر، میزان ۲,۵ μ l از بافر، ۱ μ l از dNTP، ۰,۵ μ l میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰,۵ μ l از Taq DNA polymerase و ۱ μ l از cDNA استفاده گردید و با استفاده از آب RNase Free به حجم رسانده شد و در دستگاه ترموسایکلر (Thermal Cycler, Master cycler, Eppendorf AG, Germany, Hamburg) قرار گرفت. برنامه دمایی آن روی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه

سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ ثانیه تنظیم شده و به منظور تکثیر بیشتر این واکنش ۴۰ بار تکرار گردید.

جهت اطمینان از تکثیر قطعه ژنی دربرگیرنده ژن T-bet، از الکتروفورز روی ژل اگارز ۱/۵٪ استفاده شد و برای تعیین اندازه قطعات الکتروفورز شده از 50 bp Ladder شرکت Fermentas استفاده شد. برای اطمینان از صحت انجام PCR، از کنترل منفی نیز استفاده گردید. کنترل منفی حاوی مواد مورد نیاز PCR بدون cDNA بود. در انتهای کار، به وسیله دستگاه Gel documentation و تحت اثر نور فرابنفش عکس ژل گرفته شد.

بررسی کمی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real Time PCR :

به منظور بررسی کمی تغییرات بیان ژن T-bet بین دو گروه بیمار و سالم از روش غیر اختصاصی Real-time PCR (استفاده از سایبرگرین) و دستگاه Rotor-Gene Q Series استفاده شد. جهت اطمینان از عدم حضور پیک های غیراختصاصی نیز از منحنی ذوب استفاده گردید. ژن مرجع در این مطالعه ژن β act بود. برای اطمینان از مفاهیم آماری، هر نمونه به صورت Duplicate گذاشته شد.

برای تهیه میکس واکنش برای ژن T-bet و کنترل داخلی (β act)، میزان ۱۰ میکرولیتر از 10 Master mix (μ M)، ۰.۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۱ میکرولیتر cDNA به هر میکروتیوب اضافه شد و در پایان با استفاده از آب مقطر دیونیزه حجم هر میکروتیوب به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس برنامه دمایی مطابق جدول ۲ برای آن تعریف گردید.

جدول ۲: برنامه چرخه دمایی برای ژن T-bet در Real-time PCR

تکرار	زمان	دما	مراحل
۱ سیکل	۱۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد	مرحله اول (دناتوراسیون اولیه)
۴۰ سیکل	۲۰ ثانیه ۶۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی گراد ۶۰ درجه سانتی گراد	مرحله دوم (Real Time PCR)
Melt Curve			مرحله سوم

آنالیز داده ها:

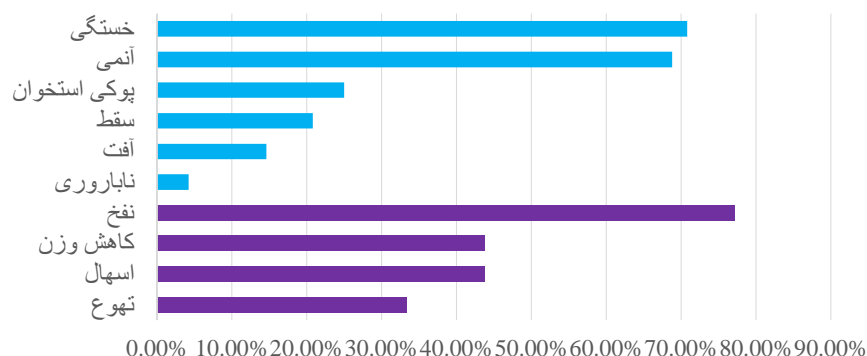
برای آنالیز داده های حاصل از Real time PCR از روش دلتا دلتا ct استفاده شد و با بهره گیری از نرم افزار prism (v.7) و SPSS آنالیز آماری انجام شد.

یافته ها:

اطلاعات افراد شرکت کننده:

در این مطالعه تعداد ۱۲ نفر (۶۰٪) زن و ۸ نفر (۴۰٪) مرد در گروه بیمار ($37,05 \pm 16,07$) و تعداد ۱۳ نفر (۶۵٪) زن و ۷ نفر (۳۵٪) مرد در گروه کنترل ($36,47 \pm 8,62$) بررسی شدند. بین سن و جنس بیماران و گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نگردید. شایع ترین علائم گوارشی بیماران مربوط به نفخ (۷۷,۱۰٪) و کاهش وزن (۴۳,۸۰٪) بوده و شایع ترین علائم غیرگوارشی آن ها مربوط به خستگی (۷۰,۸۰٪) و کم خونی (۶۸,۸۰٪) بود (شکل ۱).

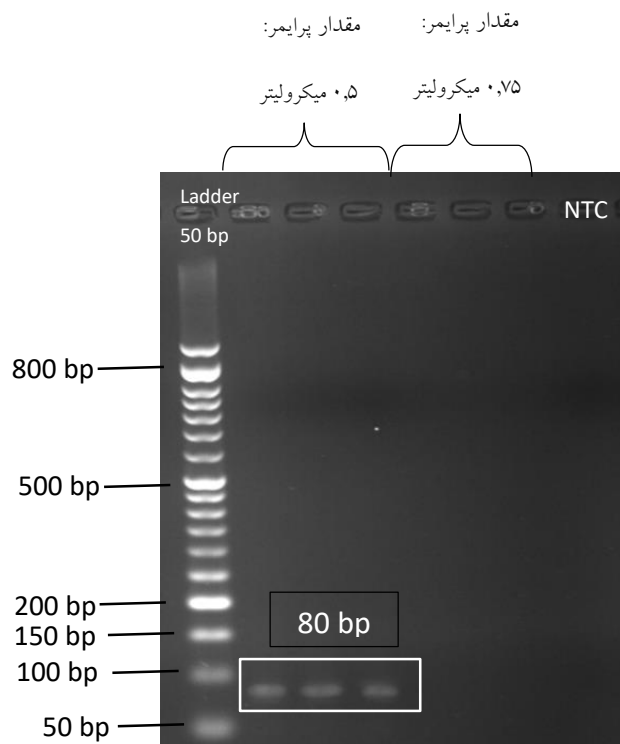
شکل ۱: نمودار علائم گوارشی (بنفش) و غیر گوارشی بیماران (آبی)



نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز 1.5 درصد:

برای بررسی عملکرد صحیح پرایمر ژن مورد نظر در تشخیص، تکثیر و اتصال اختصاصی به توالی هدف واکنش PCR برای cDNA های سنتز شده صورت گرفت. به منظور بهینه سازی واکنش PCR نیز گرادیانت دمایی برای پرایمر ژن مورد مطالعه گذاشته شد و بعد از تمام شدن واکنش، محصول بر روی ژل آگارز ۱.۵٪ بارگذاری شد و قطعه ژن در سایز مربوط به خود روی ژل مشاهده شد. اندازه قطعه تکثیر شده برای ژن T-bet بر روی ژل آگارز ۸۰ جفت باز می باشد که در شکل ۲ نشان داده شده است. در واکنش PCR صورت گرفته، در نمونه کنترل منفی هیچ بانندی مشاهده نشد بنابراین می توان نتیجه گرفت، وجود باند در سایر نمونه ها تایید کننده اختصاصیت باند و عدم وجود آلودگی است.

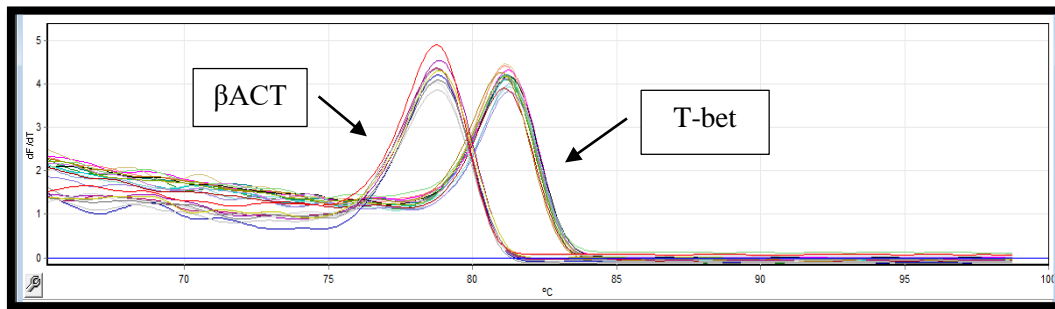
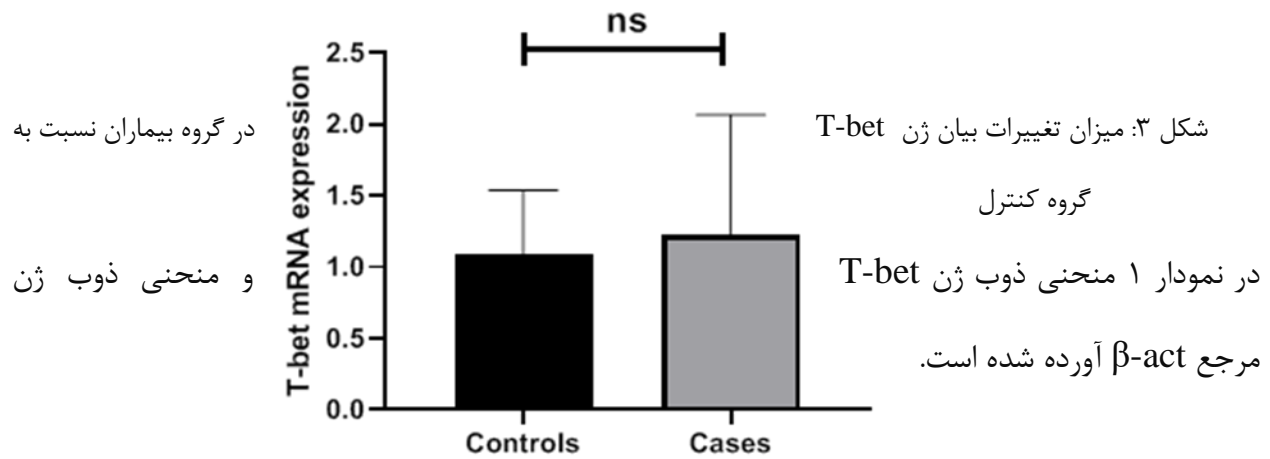
بر اساس نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز روی آگارز ۱/۵ از مقدار پرایمر ۰.۵ میکرولیتر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد جهت انجام واکنش Real-Time PCR استفاده شد.



شکل ۲: عکس ژل نمونه های مورد بررسی با روش PCR

نتایج حاصل از انجام واکنش Real Time PCR:

مقایسه بیان ژن T-bet، در نمونه های خون دو گروه بیمار و کنترل در شکل ۳ آورده شده است. آنالیز آماری به روش t-Test روی نتایج سنجش بیان ژن T-bet با استفاده از تکنیک Real-time PCR نشان داد که بیان ژن T-bet در نمونه خون گروه بیمار نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت (Pvalue: 0.27) (شکل ۳).



نمودار ۱: منحنی ذوب ژن T-bet و هم چنین ژن β ACT در تعدادی از نمونه ها

بحث

در این مطالعه بیان ژن T-bet به عنوان فاکتور اصلی تمایز سلول های Th1 از سلول های T اولیه و افزایش پاسخ های با واسطه Th1 و تشدید التهاب، در نمونه خون محیطی بیماران مبتلا به بیماری سلیاک نسبت به گروه کنترل با طراحی جفت پرایمرهای اختصاصی، ارزیابی گردید. نتایج این مطالعه حاکی از عدم وجود تفاوت معنادار بین بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت درمان با رژیم غذایی فاقد گلوتن و گروه کنترل سالم بود (Pvalue: 0.27). بیماری سلیاک یک بیماری خودایمن و مزمن روده ای است که در افراد مستعد از نظر ژنتیکی، در اثر

مصرف پروتئین گلوتن موجود در ساختمان بسیاری از غلات مانند گندم، جو و چاودار به وجود می آید و با پاسخ های ایمنی نامناسب منجر به آسیب مخاط روده می شود (11-13). ژن T-bet که با نام دیگر TBX21 هم شناخته می شود، عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی T-box است. T-bet از تنظیم کننده های اصلی تمایز سلول های Th1 از سلول های T اولیه است و سبب افزایش پاسخ های با واسطه Th1 و تشدید التهاب می گردد (8,14). نتایج مطالعات حاکی از آن است که افزایش بیان ژن T-bet می تواند در افزایش التهاب در بیماری و پیشرفت بیماری نقش داشته باشد (7,15). در مورد بیان ژن T-bet در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک مطالعات محدودی صورت گرفته است. Frisullo و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و بررسی بیان فاکتور رونویسی T-bet در سلول های ، CD8+ T cells , CD4+ , CD19+ B سل ها و مونوسیت ها در خون محیطی ۱۵ بیمار مبتلا به بیماری سلیاک درمان نشده، ۱۵ بیمار مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن و ۳۰ فرد سالم نشان دادند بیان فاکتور رونویسی T-bet در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک درمان نشده نسبت به گروه کنترل و بیماران سلیاکی درمان شده بیشتر است. آن ها این افزایش بیان را ناشی از افزایش پاسخ های ایمنی نوع اول در نتیجه مصرف گلوتن دانستند. به علاوه در این مطالعه در بیان T-bet در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد. آن ها این عدم تفاوت را به علت رعایت رژیم غذایی فاقد گلوتن در بیماران دانستند و بیان T-bet در خون محیطی را فاکتوری جهت بررسی روند بیماری و پاسخ بیماران به رژیم غذایی فاقد گلوتن در گزارش کردند. این یافته هم راستا با یافته مطالعه ما بود (14).

Monteleone و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در مطالعه ای بر روی بیان T-bet در نمونه بیوپسی روده کوچک ۱۸ بیمار مبتلا به بیماری سلیاک، ۸ بیمار مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن و ۲۷ نمونه کنترل با استفاده از تکنیک RT-PCR، افزایش بیان T-bet در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک و نبود اختلاف معنادار در بیان T-bet را در بیماران تحت رژیم نسبت به گروه کنترل گزارش کردند که میتوان نتیجه این مطالعه را نیز هم راستا یافته ما در نظر گرفت (17). از طرفی Lahdenperahc و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده

از تکنیک real-time PCR و بررسی بیان T-bet بر روی نمونه خون محیطی ۷ کودک مبتلا به بیماری سلپاک قبل و بعد از رعایت رژیم غذایی فاقد گلوتن و ۶ نمونه سالم نشان دادند میزان بیان T-bet در این بیماران قبل و بعد از رعایت رژیم نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. این اختلاف در نتیجه حاصل شده می تواند ناشی از کم بودن جمعیت مورد بررسی در مطالعه انجام شده توسط Lahdenperahc و همکاران باشد. دلیل و مکانیسم های دقیق این تغییرات هنوز به طور کامل بررسی نشده است (18).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر به ما نشان داد که می توان از جفت پرایمر طراحی شده در این تحقیق جهت بررسی بیان ژن T-bet در نمونه خون محیطی بیماران مبتلا به بیماری سلپاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن استفاده کرد. نتایج بررسی کمی تغییر بیان این ژن در بیماران مبتلا به بیماری سلپاک تحت درمان با رژیم غذایی فاقد گلوتن (به مدت ۶ ماه یا بیشتر) در مقایسه با افراد کنترل نشان داد که نمی توان از این ژن به عنوان بیومارکر تشخیصی جهت افتراق این گروه از بیماران بیماران از افراد سالم استفاده نمود. از آن جایی که آنالیز مولکولی ژن های التهابی، می تواند بیانگر چگونگی ایجاد و تکمیل کننده پازل پاتوفیزیولوژیکی بیماری سلپاک باشد، انجام مطالعات بیشتر روی ژن های مرتبط با مسیر Th1 که از مهمترین مسیرهای بیماری زایی سلپاک است توصیه می گردد.

منابع:

1. Manavalan J, Hernandez L, Shah J, immunology JK-H, 2010 undefined. Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. Elsevier [Internet]. [cited 2020 Sep 25]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885909005679>
2. James M, & BS-E journal of gastroenterology, 2001 undefined. Coeliac disease: the cause of the various associated disorders? journals.lww.com [Internet]. [cited 2021 Jun 19]; Available from: https://journals.lww.com/eurojgh/fulltext/2001/09000/coeliac_disease__the_cause_of_the_various.22.aspx
3. Catassi C, Rättsch I, Fabiani E, Rossini M, Lancet GC-T, 1994 undefined. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 19]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067369490989X>
4. Parzanese I, Qehajaj D, ... FP-W journal of, 2017 undefined. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. [cited 2021 Jun 19]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437500/>
5. Kupfer S, Clinics BJ-GE, 2012 undefined. Pathophysiology of celiac disease. giendo.theclinics.com [Internet]. [cited 2021 Jun 19]; Available from: [https://www.giendo.theclinics.com/article/S1052-5157\(12\)00095-5/abstract](https://www.giendo.theclinics.com/article/S1052-5157(12)00095-5/abstract)
6. Lebwohl B, Ludvigsson J, Bmj PG-, 2015 undefined. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. bmj.com [Internet]. [cited 2021 Nov 1]; Available from: <https://www.bmj.com/content/351/bmj.h4347.full>
7. Mazzarella G, MacDonald T, ... VS-TA journal of, 2003 undefined. Constitutive activation of the signal transducer and activator of transcription pathway in celiac disease lesions. Elsevier [Internet]. [cited 2020 Sep 25]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010643192>
8. Lazarevic V, Glimcher L, Immunology GL-NR, 201 undefined. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. nature.com [Internet]. [cited 2020 Sep 26]; Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3536>
9. Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, ... MG-N, 2012 undefined. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. nature.com [Internet]. [cited 2021 Nov 1]; Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms2260>
10. Mosmann T, today SS-I, 1996 undefined. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Elsevier [Internet]. [cited 2020 Sep 21]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167569996806062>
11. Guandalini S, pediatrics AA-J, 2014 undefined. Celiac disease: a review. jamanetwork.com [Internet]. [cited 2021 Jun 19]; Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/article-abstract/1809379>
12. Green PHR, Cellier C. Medical progress: Celiac disease. New Engl J Med [NEJM]. 2007;357(17):1731–43.

13. Al-Bawardy B, Codipilly DC, Rubio-Tapia A, Bruining DH, Hansel SL, Murray JA. Celiac disease: a clinical review. *Abdom Radiol* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Jul 2];42(2):351–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28078381/>
14. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Plantone D, Bianco A, et al. T-bet and pSTAT-1 expression in PBMC from coeliac disease patients: new markers of disease activity. *Clin Exp Immunol*. 2009 Oct;158(1):106–14.
15. Spolski R, Li P, Immunology WL-NR, 2018 undefined. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *nature.com* [Internet]. [cited 2020 Sep 21]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-018-0046-y>
16. Tack GJ, van Wanrooij RLJ, Von Blomberg BME, Amini H, Coupe VMH, Bonnet P, et al. Serum parameters in the spectrum of coeliac disease: Beyond standard antibody testing - A cohort study. *BMC Gastroenterol*. 2012;12(1).
17. Monteleone I, Monteleone G, Del G, Blanco V, Vavassori P, Cucchiara S, et al. Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in coeliac disease mucosa. *gut.bmj.com* [Internet]. 2004 [cited 2021 Nov 12]; 53:1090–5. Available from: <https://gut.bmj.com/content/53/8/1090.short>
18. Lahdenperä A, Ludvigsson J, Fälth-Magnusson K, Högberg L, Vaarala O. The effect of gluten-free diet on Th1–Th2–Th3-associated intestinal immune responses in celiac disease. *Taylor Fr* [Internet]. 2011 May [cited 2021 Nov 12];46(5):538–49. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365521.2011.551888>

Fatemeh Ganjali¹, Mohammad Rostami-Nejad², Hamid Asadzadeh Aghdaei², Mehrdad Hashemi^{3,4}

1. Department of Cellular & molecular biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Farhikhtegan Medical Convergence Science Research Center, Farhikhtegan Hospital Tehran Medical sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4. Department Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Correspondence and reprints request:

Mohammad Rostami-Nejad PhD, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: m.rostamii@gmail.com, Phone: 00982122432525, Fax:00982122432517

Quantitative evaluation of T-Bet gene expression in patients with celiac disease on a gluten-free diet

Background and Aim: Based on previous studies, T-bet can be effective in inflammation and worsening of celiac disease by improving the progression of Th1-mediated responses and the production of pro inflammatory cytokines such as interferon-gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). The aim of this study was to evaluate the expression of T-bet gene in patients with celiac disease on a gluten-free diet for 6 months or more compared with healthy individuals.

Methods: In this study, 20 peripheral blood samples were collected from patients with celiac disease and 20 samples from healthy individuals as a control group. After RNA extraction and cDNA synthesis, a specific primer pair of T-bet gene was designed and used after confirmation with blast software. PCR was performed and then T-bet gene expression was assessed by real-time PCR.

Results: In this study, 12 (60%) females and 8 (40%) males in the patient group and 13 (65%) females and 7 (35%) males in the control group were studied. T-bet gene expression was not significantly different in patients with celiac disease on a gluten-free diet for 6 months or more compared with healthy individuals (0.27 Pvalue :).

Conclusion: The results of quantitative analysis of the expression of this gene in patients with celiac disease treated with gluten-free diet (for 6 months or more) compared with controls showed that this gene cannot be used as a diagnostic biomarker to differentiate Patients from healthy individuals.

Keywords: Celiac, T-bet, Gluten Free Diet, Primer, PCR