

دانشور پزشکی

بررسی درصد سلول‌های کشنده طبیعی شبه لنفوسیت T در خون محیطی مواجهه‌یافتگان با سولفورمستارد (مدت‌زمان طولانی بعد از مواجهه)

نویسندگان: مریم رجب‌نیا چناری^۱، طوبی غضنفری^{۲*}، محمدمهدی نقی‌زاده^۳،
سقراط فقیه‌زاده^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد ایمنولوژی، دانشکده پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲. استاد، دکتری ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. کارشناسی‌ارشد آمار زیستی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران
۴. استاد، دکتری آمار زیستی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

* نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های کشنده طبیعی شبه T (NKT) جمعیتی از سلول‌های T هستند که ویژگی‌هایی از سلول‌های NK را بروز می‌دهند. این سلول‌ها علاوه بر اعمال اجرایی نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارند. نقش این سلول‌ها در افراد مواجهه‌یافته با سولفورمستارد به خوبی روشن نشده است. هدف این مطالعه بررسی درصد سلول‌های NKT در خون محیطی افراد مواجهه‌یافته نسبت به کنترل و ارتباط آن با عوارض ریوی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: از ۷۷ فرد مواجهه‌یافته با سولفورمستارد با عوارض ریوی و ۶۲ داوطلب سالم بدون هیچ شواهد کلینیکی به عنوان کنترل دعوت شد. اسپیرومتري انجام شد و شرکت‌کنندگان براساس طبقه‌بندی ابتکار جهانی برای بیماری انسدادی مزمن ریه (GOLD) به چهار گروه نرمال، خفیف‌متوسط، شدید و بسیار شدید تقسیم شدند. همچنین درصد (CD3+ CD16/56+) NKT خون محیطی در مواجهه‌یافتگان و گروه کنترل به روش فلوسایتومتری بررسی شد.

نتایج: افزایش معنی‌دار در درصد سلول‌های NKT در گروه مواجهه‌یافته نسبت به کنترل وجود داشت. همچنین براساس طبقه‌بندی GOLD، درصد سلول‌های NKT یک تفاوت معنی‌دار در افراد مواجهه‌یافته شدید در مقایسه با گروه کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: این سلول‌ها توانایی مهاجرت به ریه را دارند، بنابراین این سلول‌های سایتوتوکسیک که ما در خون محیطی این بیماران شناسایی کرده‌ایم، ممکن است منعکس‌کننده وضعیت این سلول‌ها در ریه باشد. اگرچه مطالعات بیشتری در ریه ضروری است.

واژگان کلیدی: سولفورمستارد، سلول کشنده طبیعی شبه‌لنفوسیت T، فلوسایتومتری، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وچهارم-شماره ۱۲۷
اسفند ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۴
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۱۱/۱۱
پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۵

مقدمه

سولفورموستارد^۱ یک ماده شیمیایی سایتوتوکسیک جنگی است که دارای عوارض کوتاه‌مدت و بلندمدت (حاد و مزمن) در ارگان‌های مختلف بدن است و بیماری‌های التهابی متفاوتی در ریه، چشم و پوست افراد مواجهه‌یافته ایجاد می‌کند (۱، ۲). عوارض ناشی از سولفورموستارد به دلیل خاصیت آلکیله‌کننده آن می‌باشد. این گاز قادر است با اجزای مختلف سلولی شامل DNA، RNA، پروتئین و غشاهای لیپیدی واکنش داده و آن‌ها را آلکیله کند. این واکنش‌ها می‌تواند منجر به نقص‌های متابولیکی و ژنتیکی در سلول شود (۳). در حدود ۱۰۰ هزار مواجهه‌یافته با سولفورموستارد در ایران (طی جنگ عراق و ایران، سال ۱۹۸۹-۱۹۸۱) وجود دارد که ۷۵ هزار نفر آن‌ها از مشکلات شدید ریوی که با التهاب همراه است، رنج می‌برند (۱). اثرات مزمن مواجهه با سولفورموستارد در سیستم تنفسی شبیه بیماری انسدادی مزمن ریه (Chronic Obstructive Pulmonary Disease- COPD) و در پوست مشابه پسوریازیس است (۴، ۵). همچنین برونشولیت مزمن (Bronchiolitis Obliterans-BO) از علل عمده عوارض تنفسی مواجهه با سولفورموستارد تلقی می‌شود (۶).

سلول‌های NKT (Natural killer T cells) جمعیتی از سلول‌های T هستند که خصوصیتی از سلول‌های T و NK را نشان می‌دهند (۷، ۸). این سلول‌ها با فنوتیپ CD3+ CD16+ 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. این سلول‌ها منحصر به MHC نمی‌باشند و گیرنده $\alpha\beta$ در سطح آن‌ها آنتی‌ژن‌های لیپیدی را که به وسیله مولکول‌های CD1 (مولکول‌های شبه MHC-1) عرضه می‌شوند، شناسایی می‌کنند (۸). این سلول‌ها به سرعت قادر به ترشح سایتوکاین‌هایی مثل IL-4 و IFN- γ می‌باشند و ممکن است سلول‌های B مارژینال را در تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های لیپیدی کمک کنند (۹).

پروتئین‌های سایتوتوکسیک که در گرانول‌های ترشحی سلول‌های NKT وجود دارند، در مرگ سلول‌های آلوده به ویروس و باکتری‌های درون سلولی، تخریب سلول‌های توموری، تخریب بافت‌ها در بیماری‌های خودایمن و تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی نقش دارند (۱۰-۱۳). همچنین این پروتئین‌ها به عنوان مدیاتورهای مهم در تخریب بافت ریه در BO و COPD (۱۴-۱۶) و آپوپتوز کراتینوسیت‌ها در پسوریازیس شناخته شده‌اند (۱۷، ۱۸) و افزایش تعداد سلول‌های NKT و افزایش پروتئین‌های سایتوتوکسیک از جمله پرفورین و گرانزیم B در خون محیطی افراد مبتلا به این بیماری‌ها گزارش شده است (۱۴، ۱۹-۲۱)؛ به طوری که این افزایش با شدت بیماری ارتباط مستقیم دارد (۱۴، ۱۶).

با توجه به مشابه بودن علائم مزمن مواجهه با سولفورموستارد با COPD و BO (۴، ۶) و نیز وجود شرایط التهابی در مواجهه‌یافتگان (۲۲)، و با توجه به مطالعات در خصوص افزایش تعداد سلول‌های NKT در این بیماری‌ها، بررسی تعداد سلول‌های NKT در افراد مواجهه‌یافته با سولفورموستارد ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

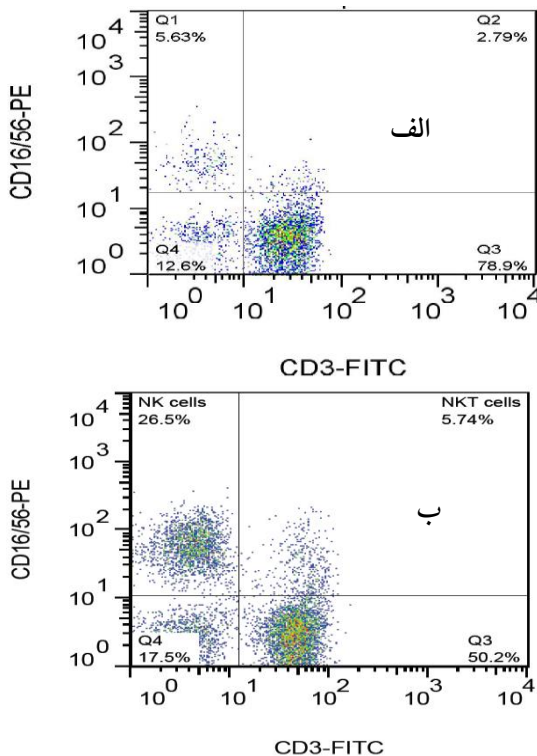
بیماریابی و نمونه‌گیری

در یک مطالعه موردی‌شاهدی، طی فراخوانی در بیمارستان ساسان در سال ۱۳۹۴، ۷۷ فرد مواجهه‌یافته با سولفورموستارد که دارای مشکلات ریوی بودند، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. معیارهای ورود به گروه مورد مطالعه شامل این‌هاست: کسانی که براساس تأیید کمیسیون پزشکی جانبازان، شیمیایی تلقی شده‌اند و دارای مشکلات ریوی هستند (از خفیف تا شدید)؛ رضایت فردی برای ورود به مطالعه دارند؛ سنشان بین ۳۰ تا ۷۰ سال است؛ عفونت حاد ندارند و از سرکوب‌کننده‌های ایمنی در دوره نزدیک به نمونه‌گیری مصرف نمی‌کنند. برای گروه کنترل نیز ۶۲ فرد سالم که از نظر سن، جنس، نژاد و خصوصیات دموگرافیک و

¹. Sulfur Mustard-SM

روی به‌طور کامل تخلیه شد و ۱ میلی‌لیتر محلول فیکس‌کننده (خریداری شده از شرکت BD) اضافه شد. این نمونه‌ها حداکثر ۶ ساعت بعد، توسط دستگاه فلوسایتمتری بررسی شد.

جهت بررسی درصد سلول‌های NKT آنتی‌بادی کوئزوگه با مواد فلورسنت شامل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی Anti-Human CD16/56-PE, Anti-Human CD3-FITC, Anti-Human CD45-PreCP استفاده شد. همه آنتی‌بادی‌ها از شرکت BD ساخت کشور آمریکا تهیه شدند. نمونه‌ها پس از خوانده شدن توسط نرم‌افزار FlowJo آنالیز شدند. ابتدا بر اساس Forward scatter و Side scatter جمعیت لنفوسیت‌ها gate شد. سپس لنفوسیت‌های CD45+ جدا شده و درصد جمعیت سلول‌های (CD3+, CD16/CD56+) NKT در نمودار چهارقسمتی (کوادرانت) مشخص شد (شکل ۱ الف و ب). در هر آنالیز، تعداد تقریبی صدهزار سلول توسط دستگاه شمارش شد و درصد سلول‌های NKT با مارکرهای مشخص تعیین گردید.



شکل ۱. سلول‌های NKT در نمودار چهارقسمتی (کوادرانت) در گروه کنترل (الف) و افراد مواجهه‌یافته (ب) در قسمت راست، بالا

منطقه جغرافیایی با گروه مواجهه‌یافته همسان‌سازی شده بودند، انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفتند. این پروژه در کمیته اخلاق پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه شاهد بررسی شده و با کد کمیته اخلاق shahed.REC.1394.31 مصوب گردید. پس از کسب رضایت آگاهانه، از هر فرد ۲ میلی‌لیتر خون محیطی جهت انجام آزمایش گرفته شد.

بررسی بالینی ریه و طبقه‌بندی بیماران ریوی

وضعیت بالینی ریه افراد توسط متخصص ریه بررسی شده و پرسشنامه مربوطه تکمیل گردید و اسپرومتری پس از ارائه آموزش و به‌صورت بهترین آزمایش از بین سه بار تکرار انجام شد. متخصص ریه با بررسی بالینی و وضعیت سمع ریه و بررسی پرونده پزشکی بیمار، وضعیت سلامت و شدت بیماری را مشخص نمود. طبق فاکتورهای اسپرومتری و طبقه‌بندی GOLD (ابتکار جهانی برای بیماری انسدادی مزمن ریه)، گروه مواجهه‌یافته براساس شدت عوارض ریوی در چهار زیرگروه نرمال، خفیف-متوسط، شدید و بسیار شدید جای گرفتند.

فلوسایتمتری

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های مورد بررسی توسط دستگاه فلوسایتمتری FACS Calibure چهار رنگی (ساخت شرکت بکتون دیکسون BD، آمریکا) انجام گرفت. بدین منظور، ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی موردنظر در لوله مخصوص فلوسایتمتری ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر خون تام تازه (با ضدانعقاد) اضافه شد. نمونه‌ها بعد از ورتکس کوتاه به مدت ۴۵ دقیقه در یخچال و در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول لیزکننده (خریداری شده از شرکت BD) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰ g سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به‌طور کامل تخلیه شد و سلول‌ها در ۲ میلی‌لیتر بافر رنگ‌آمیزی سوسپانسیون شدند. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۳۰۰ g، مایع

بررسی‌های آماری

مقایسه بین دو گروه مورد و کنترل از نظر درصد سلول‌های NKT با آزمون t انجام شد. برای تعیین ارتباط بین درصد سلول‌های NKT با طبقه‌بندی GOLD از آنالیز واریانس استفاده شد. ارزیابی داده‌ها در نرم‌افزار SPSS انجام شد و مقدار P-value کمتر از ۵ درصد به عنوان سطح معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

نتایج این مطالعه شامل بررسی درصد سلول‌های NKT و بررسی ارتباط آن‌ها با عوارض ریوی طبق طبقه‌بندی GOLD می‌باشد که بر روی ۷۷ نفر فرد مواجهه‌یافته و ۶۲ نفر کنترل در بیمارستان ساسان طی یک فراخوان انجام شد. میانگین سنی بیماران مواجهه‌یافته $7/93 \pm 52/1$ سال و در گروه کنترل میانگین سنی $8/06 \pm 49/42$ سال در زمان نمونه‌گیری بوده است ($P\text{-value} = 0/053$).

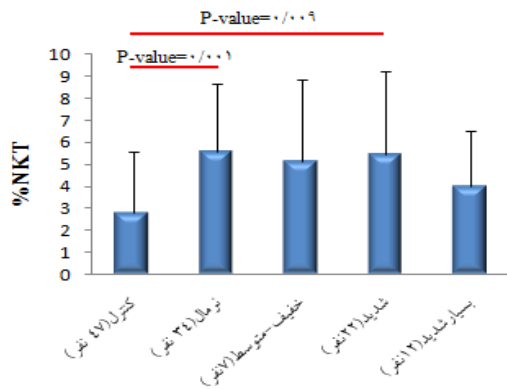
در این مطالعه، طبق نتایج به‌دست‌آمده درصد سلول‌های NKT در گروه مواجهه‌یافته نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه نتایج حاصل از درصد سلول‌های NKT

در گروه مواجهه‌یافته و کنترل

گروه	تعداد	میانگین (%)	انحراف معیار	P-value
%NKT	کنترل	۳/۴۹	۳/۲۵	۰/۰۰۲
	مواجهه‌یافته	۵/۲۲	۳/۲۳	

در این مطالعه، افراد مواجهه‌یافته براساس طبقه‌بندی GOLD در چهار گروه نرمال، خفیف-متوسط، شدید و بسیار شدید قرار گرفتند. بررسی‌ها نشان داد که از نظر درصد سلول‌های NKT تفاوت معنی‌دار افزایشی بین افراد مواجهه‌یافته نرمال و شدید با گروه کنترل وجود داشت (نمودار ۱).



نمودار ۱. نتایج حاصل از بررسی درصد سلول‌های NKT در چهار زیرگروه نرمال، خفیف-متوسط، شدید و بسیار شدید براساس طبقه‌بندی GOLD و مقایسه آن با گروه کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

در بیماران دارای عوارض تأخیری گاز خردل در طی سال‌های بعد از مواجهه، طیف گسترده‌ای از بیماری‌های ریوی مانند COPD، برونشیت مزمن، آمفیژم، برونشکتازی، تنگی تراشه و برونش‌ها و حتی تحریک‌پذیری راه‌های هوایی (HP) و فیبروز تشخیص داده شده است و پس از گذشت بیش از ۲۰ سال، برونشبولیت ابلیرانس و در مواردی نوع خاصی از COPD که ریه خردلی نامیده‌اند را به‌عنوان مهم‌ترین مشخصه پاتولوژیک قابل توجه در افراد مواجهه‌یافته گزارش کرده‌اند (۲۳). اما هنوز اطلاعات پایه‌ای در مورد عوارض تأخیری گاز خردل کافی نیست و مکانیسم‌های مؤثر در ایجاد این عوارض روشن نشده‌اند (۲۴). مطالعات انجام‌شده در سال‌های اخیر نشان داده‌اند بسیاری از عوارض تأخیری ریوی ناشی از گاز سولفورمستارد، می‌توانند به دلیل فعالیت سلول‌های التهابی و مهاجم نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها به بافت ایجاد شوند (۲۵-۲۷). بر این اساس، مکانیسم‌های التهابی مؤثر در پاتوژنز بیماری‌هایی چون COPD، برونشبولیت ابلیرانس و فیبروز را به‌عنوان فرضیه ایجاد عوارض درازمدت گاز خردل مورد بررسی قرار داده‌اند. سلول‌های NKT در پاتوژنز بیماری‌های فوق‌الذکر مثل COPD و BO نقش ایفا می‌کنند. شواهد نشان می‌دهد در

از طرف دیگر، در این مطالعه براساس طبقه‌بندی GOLD، درصد سلول‌های NKT تفاوت معنی‌دار افزایشی بین افراد مواجهه‌یافته شدید با گروه کنترل نشان داد. این امر حاکی از آن است که افزایش سلول‌های NKT علاوه بر اینکه ناشی از مواجهه است، در شدت عوارض شدید نقش احتمالی دارد. این شواهد تا حدودی ادعای ما را مبنی بر نقش سلول‌های سایتوتوکسیک NKT در فاز متوسط و شدید تأیید می‌کند؛ اما مطمئناً برای اظهار نظر شفاف‌تر به مطالعات تکمیلی بیشتری نیاز است.

درصد سلول‌های NKT در افراد مواجهه‌یافته نسبت به کنترل افزایش داشت و این تغییرات ناشی از مواجهه بود. همچنین با توجه به اهمیت سلول‌های NKT در فاز شدید و دخیل بودن سایر مکانیسم‌های سایتوتوکسیک در فاز متوسط و شدید مثل آپوپتوز، مطالعات بیشتری در این زمینه بر روی سایر سلول‌های سایتوتوکسیک لازم است. همچنین این سلول‌ها بین خون و ریه در گردش هستند؛ پس وضعیت این سلول‌ها در خون می‌تواند تا حدودی نشان‌دهنده وضعیت آن‌ها در ریه باشد که برای مشخص شدن وضعیت آن‌ها در ریه مطالعات بیشتری لازم است.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد است و با حمایت مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد انجام شده است.

منابع

1. Roshan R, Rahnama P, Ghazanfari Z, Montazeri A, Soroush MR, Naghizadeh MM, et al. Long-term effects of sulfur mustard on civilians' mental health 20 years after exposure (The Sardasht-Iran Cohort Study). *Health and Quality of Life Outcomes*. 2013;11(1):1.
2. Seagrave J, Weber WM, Grotendorst GR. Sulfur mustard vapor effects on differentiated human lung cells. *Inhalation Toxicology*. 2010;22(11):896-902.
3. Papimeisier B, Gross CL, Petrali JP, Hixson CJ. Pathology produced by sulfur mustard in human skin grafts on athymic nude mice. I. Gross and light microscopic changes. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*. 1984;3(4):371-91.

COPD استرس اکسیداتیو که به‌واسطهٔ دود سیگار القا می‌شود، باعث تحریک سلول‌های NKT و تولید IL-17 و در نهایت، اختلال در عملکرد ریه می‌شود (۲۸). همچنین در فیروز تولید IFN- γ از سلول‌های NKT باعث تولید موضعی کموکاین‌های MIP1 α و CCL3 شده که منجر به مهاجرت سلول‌های التهابی مثل گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها شده که آسیب بافت ریه را به‌دنبال دارد (۲۹). در BOS نیز افزایش تولید IFN- γ از سلول‌های NKT گزارش شده است (۱۴). تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه در مواجهه‌یافتگان با سولفورموستارد صورت نگرفته است.

در این مطالعه، طبق نتایج به‌دست‌آمده درصد سلول‌های NKT در گروه مواجهه‌یافته نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری نشان داد. در مطالعهٔ Hoge و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که تعداد سلول‌های NKT در هر دو گروه BOS و پیوندشده با وضعیت پایدار در مقایسه با کنترل، افزایش معنی‌داری داشته‌اند که با نتایج ما همخوانی دارد (۱۴). مطالعات Tang و همکاران در سال ۲۰۱۶ در چین نشان داد که تعداد سلول‌های NKT در خون محیطی افراد مبتلابه COPD نسبت به کنترل افزایش می‌یابد که با نتایج ما مطابقت دارد (۳۰). همچنین مطالعهٔ Hoge و همکاران در سال ۲۰۱۳ در استرالیا افزایش سلول‌های NKT در مایع لاوز برونش بیماران COPD نشان داد (۲۰) که حاکی از نقش مهم این سلول در پاتوژنز این بیماری می‌باشد.

4. Razavi SM, Ghanei M, Salamati P, Safiabadi M. Long-term effects of mustard gas on respiratory system of Iranian veterans after Iraq-Iran war: a review. *Chinese Journal of Traumatology*. 2013;16(3):163-8.
5. Leslie K, Millington G, Levell N. Sulphur and skin: from Satan to Saddam! *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2004;3(2):94-8.
6. Saber H, Saburi A, Ghanei M. Clinical and paraclinical guidelines for management of sulfur mustard induced bronchiolitis obliterans; from bench to bedside. *Inhalation Toxicology*. 2012;24(13):900-6.

7. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(3):231-7.
8. Zhou D, Mattner J, Cantu C, Schrantz N, Yin N, Gao Y, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*. 2004;306(5702):1786-9.
9. Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing G-W, Poles MA, Ho DD, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. 2005;434(7032):520-5.
10. Trapani JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Current Opinion in Immunology*. 2000;12(3):323-9.
11. Van Dommelen SL, Sumaria N, Schreiber RD, Scalzo AA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity*. 2006;25(5):835-48.
12. Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current Opinion in Immunology*. 2007;19(3):339-47.
13. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological Reviews*. 2010;235(1):35-54.
14. Hodge G, Hodge S, Holmes-Liew C-L, Reynolds PN, Holmes M. Bronchiolitis obliterans syndrome is associated with increased peripheral blood natural killer and natural killer T-like granzymes, perforin, and T-helper-type 1 pro-inflammatory cytokines. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2012;31(8):888-95.
15. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Research*. 2010;11:76.
16. Vernooy JH, Möller GM, van Suylen RJ, van Spijk MP, Cloots RH, Hoet PH, et al. Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(5):464-72.
17. Massari LP, Kaštelan M, Laškarić G, Zamolo G, Massari D, Rukavina D. Analysis of perforin expression in peripheral blood and lesions in severe and mild psoriasis. *Journal of Dermatological Science*. 2007;47(1):29-36.
18. Kastelan M, Massari L, Peternel S. [The role of perforin mediated cell cytotoxicity in psoriasis]. *Lijecnicki Vjesnik*. 2009;132(11-12):361-4.
19. Kaštelan M, Prpić Massari L, Gruber F, Zamolo G, Žauhar G, Čoklo M, et al. Perforin expression is upregulated in the epidermis of psoriatic lesions. *British Journal of Dermatology*. 2004;151(4):831-6.
20. Hodge G, Mukaro V, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Enhanced cytotoxic function of natural killer and natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway. *Respirology*. 2013;18(2):369-76.
21. Hodge S, Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway granzyme b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2006;3(4):179-87.
22. Malaviya R, Sunil VR, Cervelli J, Anderson DR, Holmes WW, Conti ML, et al. Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;248(2):89-99.
23. Lari SM, Attaran D, Towhidi M. *COPD Due to Sulfur Mustard (Mustard Lung)*: INTECH Open Access Publisher; 2012.
24. Ghanei M, Adibi I. Clinical review of mustard lung. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2015;32(2):58-65.
25. Pourfarzam S, Ghazanfari T, Yaraee R, Ghasemi H, Hassan ZM, Faghihzadeh S, et al. Serum levels of IL-8 and IL-6 in the long term pulmonary complications induced by sulfur mustard: Sardasht-Iran Cohort Study. *International Immunopharmacology*. 2009;9(13):1482-8.
26. Ekstrand-Hammarström B, Wigenstam E, Bucht A. Inhalation of alkylating mustard causes long-term T cell-dependent inflammation in airways and growth of connective tissue. *Toxicology*. 2011;280(3):88-97.
27. Balali-Mood M, Hefazi M, Mahmoudi M, Jalali E, Attaran D, Maleki M, et al. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2005;19(6):713-21.
28. Pichavant M, Remy G, Bekaert S, Le Rouzic O, Kervoaze G, Vilain E, Just N, Tillie-Leblond I, Trottein F, Cataldo D, Gosset P. Oxidative stress-mediated iNKT-cell activation is involved in COPD pathogenesis. *Mucosal Immunology*. 2014;7(3):568.
29. Paget C, Trottein F. Role of type 1 natural killer T cells in pulmonary immunity. *Mucosal Immunology*. 2013.
30. Tang Y. Increased numbers of NK cells, NKT-like cells, and NK inhibitory receptors in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest Journal*. 2016;149(4_S):A380-A.

Evaluation of the percentage of peripheral blood natural killer T like cells in sulfur mustard-exposed individuals (long term after exposure)

Maryam Rajabnia Chenary¹, Tooba Ghazanfari^{1*}, Mohammad Mehdi Naghizadeh², Soghrat Faghihzadeh¹

1. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Non-communicable Diseases Research Center, Fasa University, Fars, Iran.

* Corresponding author e-mail: tghazanfari@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Natural killer T like (NKT) cells are a population of T cells that show NK cells features. These cells in addition to administrative actions, have an important role in the regulation of immune responses. The role of these cells in people exposed to sulfur mustard (SM) are not well known. The aim of this study was to determine the percentage of NKT cells in the peripheral blood of SM exposed people and its association with pulmonary complications.

Materials and Methods: 77 SM exposed patients with lung complications and 62 healthy volunteers as control without any clinical complications were invited to participate. Spirometry was performed and participants were divided into four groups (normal, mild-moderate, severe, and very severe) according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Also, percentage of peripheral blood NKT (CD3+ CD16/56+) in SM exposed individuals and control group was determined with flow cytometry.

Results: There was a significant increase in the percentage of NKT-like cells in exposed group compared with controls. Also, according to GOLD classification, NKT cells percentage showed a significant difference in severe exposed as compared to the control group.

Conclusion: NKT cells have the potential to migrate to the lung. So, these cytotoxic cells identified in the peripheral blood of these patients may be reflective of cell populations in the lung of this patients. However, further studies are necessary in the lung.

Key words: Sulfur mustard, Natural killer T like cell, Flow cytometry, Peripheral blood mononuclear cells