دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وششم–شماره ۱۳۸
دی ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۱۰/۰۳
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۹

بررسی درصد سلول‌های Treg در خون محیطی افـراد مواجهـه یافتـه بـا سولفورموسـتارد در مقایسه با افراد سالم

نویسندگان: نفیسه زند[۱]، طوبی غضنفری*[۲]، محمود بزرگمهر[۳]، علیرضا ثابت‌پور[٤]، سقراط فقیه‌زاده[٥]

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات آسیب‌شناسی و سرطان، دانشکده پزشکی ایران، تهران، ایران
٤. فوق تخصص ریه، کالج سلطنتی متخصصان داخلی، لندن، انگلستان
٥. گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

* نویسنده مسئول: طوبی غضنفری **E-mail: tghazanfari@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های T تنظیمی (Treg) از زیرگروه‌های لنفوسیت‌ها هستند که بـا مکانیسـم‌هـای وابسته به تماس سلولی و ترشح عوامل محلول باعث کنترل التهاب و برقراری هموستاز مـی‌شـوند. بـا توجه به این‌که در افراد مواجهه یافته با سولفورموسـتارد عـدم تعـادل سـلول‌هـای ایمنـی و اخـتلال در هموسـتاز وجـود دارد، در مطالعـه حاضـر درصـد سـلول‌هـای Treg بـا مارکرهـای CD4,CD25,CD127,FOXP3 در خون محیطی افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد در مقایسه با گـروه کنترل و رابطه آن با عوارض ریوی درازمدت بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها از ۱۲ فرد مواجهه یافته با سولفورموستارد و ۱۲ داوطلب سالم دعوت شد. بررسـی‌هـای بالینی گروه مورد توسط پزشکان فوق تخصص ریه و اسپیرومتری، توسط اپراتور تست ریه انجام شد. پس از جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی درصد سـلول‌هـای Treg بـا روش فلوسـایتومتری تعیین شد.

نتایج: درصد سلول‌های Treg در افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. هیچ ارتباط معناداری نیز بین پارامترهای اسپیرومتری و درصد این سلول‌ها در افراد مواجهه یافته مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به مطالعه حال حاضر می‌توان گفت در جانبازان شیمیایی با عوارض ریـوی خفیـف هیچ تفاوتی ازلحاظ درصد سلول‌های Treg با افراد سالم وجود ندارد و برای درک نقش این سلول‌هـا در عوارض ریوی این بیماران مطالعات بیشتری لازم است.

واژگان کلیدی: سلول‌های Treg، سولفورموستارد، اسپیرومتری، جانبازان شیمیایی

مقدمه

گاز خردل (Sulfur Mustard-SM) ماده‌ای تاول‌زا است که به‌عنوان سلاح شیمیایی در جنگ جهانی اول و نیز در طول جنگ عراق علیه ایران مورداستفاده قرارگرفته است(۱). این ترکیب از طریق استنشاق، تماس پوستی، سطح چشم‌ها و یا دستگاه گوارش با مصرف مواد غذایی آلوده جذب می‌شود عوارض زودرس ناشی از مواجهه با گاز خردل در هفته اول و عوارض تأخیری آن ۱۰ تا ۱۵ سال بعد و حتی در سال‌های طولانی‌تر پس از ضایعه اولیه نمایان می‌شوند به‌طوری‌که SM می‌تواند اثرات و عوارضی درازمدت حتی ٤٠ سال پس از مواجهه ایجاد کند. بعد از گذشت بیش از دو دهه هنوز بیش از صد هزار مصدوم ایرانی از عوارض تأخیری همچون بیماری انسدادی مزمن ریوی، فیبروز ریوی و پیگمانتاسیون غیرطبیعی پوست، انواع سرطان‌ها، بیماری زخم قرنیه عودکننده و کونژیونکتویت مزمن رنج می‌برند. مطالعه کوهورت سردشت ایران نشان می‌دهد که ۲۰-۱٦ سال پس از مواجهه با گاز خردل در حدود ۸۰٪ از افراد مواجهه یافته علائم COPD (Chronic obstructive pulmonary disease)ازجمله سرفه، تولید خلط، تنگی نفس، درد سینه و دیس پنه شبانه را بروز می‌دهند(۲). علی‌رغم مطالعات سلولی و مولکولی انجام‌شده مکانیسم آسیب‌های مزمن ناشی از مواجهه با SM هنوز شناخته‌نشده است. به‌طورکلی مطالعات انجام‌شده در مصدومین شیمیایی حاکی از تغییر در بیان سایتوکاین های التهابی و سایتوکاین های پروفیبروتیک مانند IL-17, IL-10, IL-8, IL-6, IL-1β, „TGF-β1, TNF-αو تغییر در سلول‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی مانند NK , cells, Th17 T cytotoxicنسبت به گروه کنترل می‌باشد(۳, ٤, ٥ ,٦, ۷).

یکی از زیرگروه‌های سلول‌های T سلول‌های T تنظیمی می‌باشند. این سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های اجرایی با ترشح عوامل محلول و یا توسط مکانیسم‌های وابسته به تماس سلولی، ازیک‌طرف در حفظ تولرانس محیطی و کاهش التهاب نقش دارند و از طرف دیگر با سرکوب پاسخ‌های ایمنی در پاتوژنز بیماری‌های التهابی مؤثر می‌باشند. در بیماری‌هایی همچون COPD که علائم مزمن آن مشابه عوارض تأخیری در افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد می‌باشد، عملکرد سلول‌های Treg کاهش‌یافته است(۸).

در این خصوص، ایمانی و همکاران در ۲۰۱٦ با سنجش فراوانی سلول‌های Treg در خون محیطی مصدومین شیمیایی با استفاده از مارکرهای CD4، FOXP3 نشان دادند که تعداد این دسته از سلول‌ها در مصدومین شیمیایی نسبت به افراد مبتلابه COPD و کنترل سالم افزایش‌یافته است(۷). در مطالعه دیگری، ایمانی و همکاران در ۲۰۱٦، با سنجش بیان مارکرهای FOXP3و IL-10 در بافت بیوپسیtransbronchial نشان دادند که در مصدومین شیمیایی بیان این مارکرها نسبت افراد مبتلابه COPD و افراد کنترل سالم کاهش‌یافته است(۳).

با توجه به این مطلب که CD4, FOXP3 ایمونوفنوتایپ مناسبی برای Treg نبوده و شامل non-Treg ها هم می‌شود که ماهیت متفاوتی از Treg داشته و در اثر القای محیطی به بیان گذرای FOXP3 می‌پردازند (۹)، در این مطالعه بر آن شدیم تا درصد سلول‌های Treg در خون مصدومین شیمیایی را با استفاده از مارکرهایCD4, CD25 ، CD127 و FOXP3 اندازه‌گیری نماییم.

مواد و روش‌ها

جامعه موردمطالعه

در این مطالعه که از نوع مورد شاهد می‌باشد، حجم نمونه موردنیاز، بر اساس اطلاعات به دست آمده از مطالعه ایمانی و همکاران تعیین‌شده است (۷). در این مطالعه درصد سلول‌های CD4+FOXP3+ در گروه کنترل ٤/٩٥±١.٢١ و در گروه جانبازان ٨/٧١±٢.٤٦ بوده است. با در نظر گرفتن خطای ٥٪ و توان ٩٥٪ با کمک فرمول زیر و با احتساب بزرگ‌ترین انحراف معیار، ۱۲ نفر مواجهه یافته با سولفورموستارد که دارای عوارض ریوی

بودند در گروه مورد و ۱۲ نفر افراد سالم به‌عنوان گروه کنترل موردمطالعه قرار گرفتند.

$$N=\frac{2S_1^2}{\Delta^2}(Z_\alpha+Z_\beta)^2 \qquad N=\frac{۲\times(۱/۹۶+۱/۶٤)^۲}{(۸/۷۱-٤/۹٥)^۲}=۱۲$$

این مطالعه با کد IR Shahed.REC.13961218 در هشتمین جلسه کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹٦ مصوب گردیده است.

معیارهای ورود به مطالعه برای گروه مورد شامل کسانی است که بر اساس تائید کمیسیون پزشکی جانبازان، شیمیایی تلقی شده‌اند و دارای مشکلات ریوی هستند. رضایت فردی برای ورود به مطالعه داشته‌اند سن افراد بین ۳۵ تا ٦٥ سال بوده و به بیماری زمینه‌ای خاصی مبتلا نبودند. هیچ‌یک از افراد شرکت‌کننده در مطالعه سابقه مصرف سیگار نداشتند.

معاینه ریوی و اسپیرومتری

بررسی‌های بالینی گروه مورد توسط پزشکان فوق تخصص ریه صورت گرفت و افراد انتخاب شده برای گروه کنترل نیز از نظر سلامت و ابتلا به بیماری های زمینه ای بررسی گردیدند. اسپیرومتری برای گروه مورد طبق پروتکل انجمن توراکس آمریکا، توسط اپراتور تست ریه انجام شد و پس از انجام چند مورد ثبت مقادیر ریوی، بهترین اندازه با توجه به همکاری بهینه بیماران ثبت گردید.

فلوسایتومتری

جمع‌آوری نمونه

۲/۵ mL خون سیاهرگی از افراد تحت آزمایش، در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA –k3 جمع‌آوری شد.

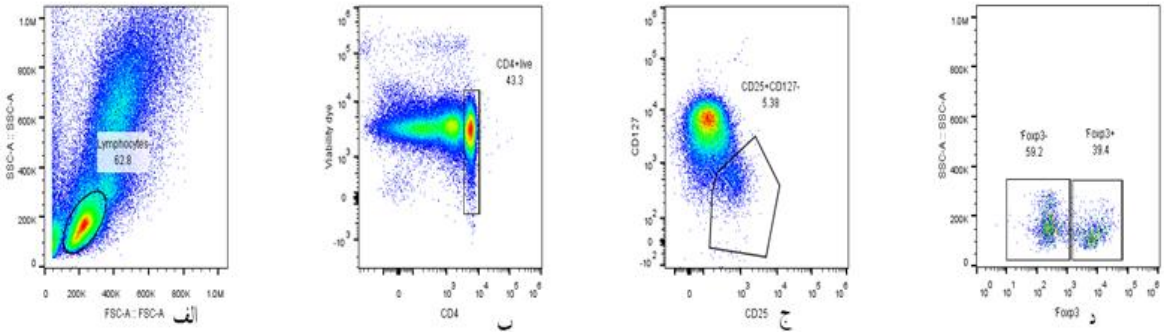
رنگ‌آمیزی

ابتدا سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC)به روش گرادیان غلظت فایکول (Inotrain, Germany) جداسازی شد و به‌منظور تعیین حیات سلول‌ها (viability) به مقدار ۱ لامبدا از رنگ Fixable viability stain 780 (BD Bioscience, San Jose, CA)را به یک‌میلیون سلول در PBS ۱mL اضافه شد و سپس ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شد. سپس با اضافه کردن ۲mL بافر رنگ‌آمیزی به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰g سانتریفوژ شده بعد از خالی کردن مایع رویی این مرحله دوباره تکرار شد. به‌منظور ایمونوفنوتایپینگ سلول‌ها به میزان یک‌میلیون سلول در ۱۰۰ لامبدا بافر رنگ‌آمیزی، ۰.۷ لامبدا آنتی‌بادی ضد CD4، ۳ لامبدا آنتی‌بادی ضد CD127، ۲۰ لامبدا آنتی‌بادی ضد CD25 (مقدار آنتی‌بادی‌های استفاده‌شده از ست آپ و تیتراسیون آنتی‌بادی‌ها به‌دست‌آمده است) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال ٤ درجه در تاریکی انکوبه گردید. سپس با ۲mL بافر رنگ‌آمیزی در دمای ٦ درجه به مدت ٦ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتریفوژ شده و پس از تخلیه مایع رویی، با ۱mL بافر فیکس/پرم به مدت ٤۰ دقیقه در یخچال ٤ درجه در تاریکی انکوبه شد. پس از اضافه کردن ۱mL بافر پرم/واش در دمای ٦ درجه به مدت ٦ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتریفوژ انجام‌شده و پس از خالی کردن مایع رویی، مجدداً با اضافه کردن ۲mL بافر پرم/واش در دمای ٦ درجه به مدت ٦ دقیقه با دور g ۳۵۰ سانتریفوژ انجام‌شده و پس از خالی کردن مایع رویی، ۲۰ لامبدا آنتی‌بادی ضد FOXP3 و ۸۰ لامبدا بافر پرم/واش به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت ٤۰ دقیقه در یخچال ٤ درجه در تاریکی انکوبه شد. سپس با افزودن ۲mL بافر پرم/واش در دمای ٦ درجه به مدت ٦ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتریفوژ کرده و پس از خالی کردن مایع رویی، مجدداً با افزودن ۲mL بافر پرم/واش در دمای ٦ درجه به مدت ٦ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتریفوژ کرده و پس از خالی کردن مایع رویی در ۳۵۰ لامبدا بافر رنگ‌آمیزی خوانش با دستگاه فلوسایتومتر (Thermo Fisher, USA)Attune nxt flowcytometr انجام گرفت. نمونه‌ها پس از خوانش با نرم‌افزار Flowjo-v10 مورد آنالیز قرار گرفت.

استراتژی گیتنگ

ابتدا محدوده لنفوسیتی بر اساس FSC-A در مقابل SSC-A تعیین شد. سپس، در سلول‌های زنده‌ای که CD4+ بودند گیت CD25 در مقابل CD127 کشیده شد و

سلول‌هایی که ازنظر مارکر CD127 منفی و ازنظر مارکر CD25 مثبت بودند انتخاب شدند. در میان سلول‌هایی که CD25+CD127- بودند آن‌هایی که FOXP3 را بیان می‌کردند از سلول‌هایی که فاقد این مارکر بودند با رسم گیت از هم تفکیک شدند. با این استراتژی مقایسه بین دو گروه کنترل و مواجهه یافته صورت گرفت.



شکل ۱. نحوه gating و به دست آوردن سلول‌های Treg با نرم‌افزارFlowjo-v10

الف) سلول‌های لنفوسیت بر اساس پارامتر SSC-A و پارامتر FSC-A ب) سلول‌های +CD4 زنده ج) سلول های CD4+CD25+CD127- د) سلول های +CD4+CD25+CD127- FOXP3

بررسی‌های آماری

مقایسه بین دو گروه مورد و کنترل ازنظر درصد سلول‌های Treg با آزمون T انجام شد. تعیین ارتباط بین درصد سلول‌های Treg با پارامترهای اسپیرومتری با استفاده از ضریب هم‌بستگی اسپیرمن انجام گرفت و مقادیر کمتر ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته‌شده است. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Spss نسخه ۲۲ انجام‌شده است.

نتایج

طبق جدول شماره ۱، ازلحاظ درصد سلول‌های CD4+CD25+CD127-FOXP3+ بین گروه مورد و کنترل تفاوت معناداری دیده نشد. با توجه به این جدول درصد سلول‌های CD4+CD25+CD127- بین گروه مورد و کنترل تفاوت هم تفاوتی نداشت.

بر اساس جدول شماره ۲ بین پارامترهای اسپیرومتری و درصد سلول‌های Treg در افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد، هم‌بستگی معنی‌داری مشاهده نگردید.

جدول ۱. مقایسه نتایج حاصل از درصد سلول‌های Treg در میان لنفوسیت ها در گروه مواجهه یافته و کنترل

گروه		تعداد	میانگین (٪)	انحراف معیار	P-value
درصد سلول‌های CD4+Cd25+CD127-FOXP3+	کنترل	۱۲	۱/۴۲	۰/۸۳	۰،۷۶
	مواجهه یافته	۱۲	۱،۵۱	۰،۴۷	
درصد سلول‌های CD4+Cd25+CD127-	کنترل	۱۲	۳،۷۴	۲،۰۲	۰،۴۱۳
	مواجهه یافته	۱۲	۴،۳۸	۱،۶۹	

جدول ۲. بررسی همبستگی سلول‌های Treg با پارامترهای اسپیرومتری در گروه مواجهه یافته

	FVC		FEV1		FEV1/FVC	
	R	p	R	p	r	p
٪ CD4+Cd25+CD127-FOXP3+	۰،۰۷۶	۰/۸۲۵	۰،۰۶۲	۰/۸۵۷	۰،۰۰۵	۰/۹۸۷
٪ CD4+Cd25+CD127-	۰،۰۹۴	۰/۷۸۳	۰،۱۳	۰/۷۰۴	۰،۰۵۹	۰/۸۴۶

P=P-value
r = Spearman's correlation coefficient

بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های Treg در کنترل التهاب و هموستاز با ترشح عوامل محلول و یا توسط مکانیسم‌های وابسته به تماس سلولی نقش دارند. در بیماری‌های متعددی نظیر بیماری‌های اتو ایمیون بیماری‌های التهابی مزمن مانند COPD دچار تغییرات و کاهش عملکرد شده و استفاده از آن‌ها به‌عنوان گزینه‌ای برای ایمونوتراپی در شرایط مثل پیوند و در بیماری‌های اتوایمیون مطرح است(۱۰). عوارض ریوی سولفورموستارد بر جانبازان شیمیایی مشابه با بیماری مزمن COPD است. در این بیماری همانند سایر بیماری‌ها التهابی مزمن نقایصی در سلول‌های Treg گزارش‌شده است که با عملکرد ریوی آن‌ها مرتبط است. ازآنجاکه در جانبازان شیمیایی تغییرات ایمونولوژیک متعدد در سایتوکاین‌های التهابی و سلول‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی نسبت به گروه کنترل، گزارش‌شده است (۳,٤,٦,۷).

این‌طور می‌توان نتیجه گرفت که در این افراد یک التهاب کنترل نشده وجود دارد. لذا بررسی سلول‌های Treg و زیر جمعیت‌های آن حائز اهمیت است. ما برای اولین بار در جانبازان شیمیایی از فلوسایتومتری ۵ رنگ برای ایمونوفنوتایپینگ و بررسی درصد سلول‌های Treg استفاده کردیم. شناسایی اختصاصی این سلول‌ها استفاده از مارکرهای متعددی را می‌طلبد.

مولکول CD25 پذیرنده IL-2 بوده که هنگام فعال شدن T سل‌ها روی آن‌ها بیان می‌شود سلول‌هایTreg این مارکر را به میزان بالایی بیان کرده و به‌وسیله آن یکی از مکانیسم‌های تنظیمی خود که محروم کردن سایر T سل‌ها از سیگنالینگ IL-2 است می‌پردازند(۱۱). اما بیان این مارکر روی سایر T سل‌ها شناسایی Tregهای خالص را با مشکل مواجه کرده و به این منظور از مارکر دیگری به نام CD127 استفاده شد. CD127 که رسپتور IL-7 است به میزان کم و در حد منفی بر روی Treg ها بیان می‌شود(۱۲). استفاده از ۳ مارکرCD127 CD25 و CD4 یکی از شاخصه‌های Treg است که در مطالعات مختلفی از آن استفاده‌شده است(۹).در مطالعه حاضر تفاوت معناداری بین گروه مواجهه یافته و کنترل از لحاظ درصد CD4+,CD25+,CD127- مشاهده نشد.

FOXP3 یکی از مارکرهای اختصاصی و الزامی برای سرکوبگری سلول‌های Treg بوده که نقش موتاسیون در آن در بیماری IPEX کاملاً محرز است(۱۳, ١٤). مطالعات نشان می‌دهد استفاده از این مارکر به همراه CD25،CD127 و CD4 برای شناسایی و تعریف Treg الزامی است و حداقل مارکرهایی است که باید بدین منظور مورداستفاده قرار گیرد(۹). بررسی درصد سلول‌های CD4+,CD25+,CD127-,FOXP3+ در مطالعه ما تفاوت معناداری را بین گروه کنترل و مواجهه یافته نشان نداد.

مطالعه ایمانی و همکاران مبنی بر بررسی فراوانی سلول‌های Treg با مارکرهای CD4 و FOXP3 و افزایش آن در خون دو گروه افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد و بیماران مبتلابه COPD نسب به گروه کنترل، با یافته‌های ما در این مطالعه متناقض است. یکی از دلایل این موضوع انتخاب تنها دو مارکر برای تعریف سلول‌های Treg باشد در این صورت سلول‌های CD45RA(-)FOXP3(lo) جزو سلول‌های Treg محسوب می‌شوند که نه‌تنها خاصیت سرکوبگری ندارند بلکه قادرند سایتوکاین های پیش التهابی نیز تولید کنند درنتیجه FOXP3 برای شناسایی سلول‌های Treg لازم است اما کافی نیست.

ضمن اینکه بیماران موردمطالعه آن‌ها نسبت به گروه بیماران مطالعه ما از آسیب ریوی بیشتری برخوردار بوده و میانگینFEV1/FVC آن‌ها از بیماران ما کمتر است. بررسی فراوانی سلول‌های Treg در سه گروه جانبازان شیمیایی با عوارض ریوی خفیف، متوسط و شدید می‌تواند روشن‌کننده این موضوع باشد ممکن است این سلول‌ها با پیشرفت به مرحله متوسط و شدید تغییرات محسوس‌تری را نشان دهند.

مطالعه Paats و همکاران در مبتلایان COPD و اندازه‌گیری سلول‌های Treg(CD4+,CD25+,FOXP3+) به

روش فلوسایتومتری نشان می‌دهد ازلحاظ سلول‌های Treg تفاوت معناداری را وجود ندارد(۱۵). و این با نتیجه مطالعه ما هم‌خوانی دارد هم‌چنین Barceló و همکاران در بیماران مبتلابه COPD عدم‌تغییر معنادار سلول‌های +CD4+CD25 در خون و لاواژ مبتلایان COPD نسبت به گروه کنترل را گزارش کردند(۱۶).که با نتایج حاصله در این مطالعه هم‌خوانی دارد.

در مطالعه حاضر، هیچ‌گونه ارتباطی بین پارامترهای اسپیرومتری و درصد سلول‌های Treg مشاهده نشد. گزارش‌ها حاکی از آن است اتکا بر پارامترهای اسپیرومتری برای ارزیابی عملکرد ریه قابل‌اعتماد نبوده و در رابطه با راه‌های هوایی کوچک دچار مشکل است. چنان چه در بیماری آسم نیز استفاده از اسپیرومتری در ۳۰ درصد موارد باعث تشخیص کاذب و در ٥٤ درصد موارد سبب عدم‌تشخیص این بیماری شده است(۱۷).

مطالعه حال حاضر تنها درصد سلول‌های Treg را در خون محیطی موردبررسی قرار داده است. درصورتی‌که برای فهم بهتر نقش این سلول‌ها در جانبازان شیمیایی ارزیابی عملکرد آن‌ها و سلول‌های Teffector کارساز خواهد بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه حال حاضر می‌توان گفت در جانبازان شیمیایی با عوارض ریوی خفیف هیچ تفاوتی ازلحاظ درصد سلول‌های Treg با افراد سالم مشاهده نشده و برای درک نقش این سلول‌ها در عوارض ریوی این بیماران 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 انجام‌شده است.

منابع

1. Mansour Razavi S, Salamati P, Saghafinia M, Abdollahi M. A review on delayed toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2012;20(1):51.
2. Emami MH, Talaei M, Panahi Y, Saburi A, Ghanei M. Efficacy of omeprazole on cough, pulmonary function and quality of life of patients with sulfur mustard lung injury: A placebo-control, cross-over clinical trial study. Journal of Research in Medical Sciences: The official Journal of Isfahan University of Medical Sciences 2014;19(11):1027.
3. Imani S, Salimian J, Fu J, Ghanei M, Panahi Y. Th17/Treg-related cytokine imbalance in sulfur mustard exposed and stable chronic obstructive pulmonary (COPD) patients: correlation with disease activity. Immunopharmacology and Immunotoxicology 2016;38(4):270-80.
4. Emad A, Emad Y. Levels of cytokine in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in patients with pulmonary fibrosis due to sulfur mustard gas inhalation. Journal of Interferon & Cytokine Research 2007;27(1):38-43.
5. Ghazanfari T, Kariminia A, Yaraee R, Faghihzadeh S, Ardestani SK, Ebtekar M, et al. Long term impact of sulfur mustard exposure on peripheral blood mononuclear subpopulations—Sardasht-Iran Cohort Study (SICS). International Immunopharmacology 2013;17(3):931-5.
6. Shaker Z, Hassan Z, Sohrabpoor H, Mosaffa N. The immunostatus of T helper and T cytotoxic cells in the patients ten years after exposure to sulfur mustard. Immunopharmacology and Immunotoxicology 2003;25(3):423-30.
7. Imani S, Salimian J, Bozorgmehr M, Vahedi E, Ghazvini A, Ghanei M, et al. Assessment of Treg/Th17 axis role in immunopathogenesis of chronic injuries of mustard lung disease. Journal of Receptors and Signal Transduction 2016;36(5):531-41.
8. Roos-Engstrand E, Pourazar J, Behndig AF, Bucht A, Blomberg A. Expansion of CD4+ CD25+ helper T cells without regulatory function in smoking and COPD. Respiratory Research 2011;12(1):74.
9. Santegoets SJ, Dijkgraaf EM, Battaglia A, Beckhove P, Britten CM, Gallimore A, et al. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. Cancer Immunology, Immunotherapy 2015;64(10):1271-86.
10. Singer BD, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy. Frontiers in Immunology 2014;5:46.
11. Letourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2009;123(4):758-62.
12. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. Journal of Experimental Medicine 2006;203(7):1693-700.
13. Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. Cellular & Molecular Immunology 2015;12(5):558.
14. Sawant DV, Vignali DA. Once a Treg, always a Treg? Immunological Reviews 2014;259(1):173-91.
15. Paats MS, Bergen IM, Hoogsteden HC, van der Eerden MM, Hendriks RW. Systemic CD4+ and CD8+ T cell cytokine profiles correlate with GOLD stage in stable COPD. European Respiratory Journal 2012:erj00796-2011.
16. Barcelo B, Pons J, Ferrer J, Sauleda J, Fuster A, Agusti A. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+ CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. European Respiratory Journal 2008;31(3):555-62.
17. Eusebio M, Kuna P, Kraszula L, Kupczyk M, Pietruczuk M. The relative values of CD8+ CD25+ FOXP3brigh Treg cells correlate with selected lung function parameters in asthma. International Journal of Immunopathology and Pharmacology 2015;28(2):218-26.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
26th Year, No.138
December-January
2018-2019

Received: 10/10/2018
Last revised: 24/12/2018
Accepted: 30/12/2018

Evaluation of percentage of regulatory T cells in peripheral blood of sulfur mustard-exposed in comparison with healthy individuals

Nafiseh Zand[1], Tooba Ghazanfari[2*], Mahmood Bozorgmehr[3], Alireza Sabetpour[4], Soghrat Faghihzade[5]

1. Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Oncopathology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Pulmonologist, London, UK.
5. Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

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

Abstract

Background and Objective: Regulatory T cells (Treg) are the subgroups of lymphocytes that control inflammation response and regulates homeostasis by mechanisms of cellular contact and secretion of soluble agents. Here, we investigated percentage of Treg in peripheral blood of sulfur mustard-exposed patients with CD4, CD25, CD127, FOXP3 markers in comparison with healthy individuals and the correlation between these cells and long-term pulmonary complications.

Materials and Methods: In this study, 12 sulfur mustard-exposed patients and 12 healthy volunteers were invited. Clinical inspections of both groups were done by pulmonary specialists as well as spirometric evaluation that was conducted by pulmonary function test operators. After isolation of peripheral blood mononuclear cells, the percentage of Treg cells was determined by flow cytometry.

Results: Percentage of Treg cells was not significantly different in those exposed to sulfur mustard. Also, there was no significant correlation between spirometric parameters and percentage of these cells.

Conclusion: According to the current study, there is no difference in the percentage of Treg cells between exposed patients with mild pulmonary complications and healthy volunteers and more studies are needed to understand the role of these cells in the pulmonary complications of these patients.

Keywords: Regulatory T cells, Sulfur mustard, Spirometry, Chemical victims