

کاهش سطح سرمی ویتامین D در افراد مواجه شده با سولفورموستارد مبتلا به عوارض درازمدت ریوی

نویسندگان: محمدمهدی ادیبزاده^۱، طوبی غضنفری^{۲*}، سوسن اردستانی^۳،
سقراط فقیهزاده^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنولوژی، دانشکده پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲. استاد، دکتری ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. استاد، دکتری بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴. استاد، دکتری آمار، دانشکده پزشکی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

*نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: ویتامین D به‌عنوان یک عامل ایمنومودولاتور ابزار مؤثری جهت تعدیل پاسخ‌های التهابی می‌باشد؛ همچنین ویتامین D از تکثیر بی‌رویه لنفوسیت‌ها، پاسخ‌های التهابی نوتروفیل‌ها و به‌طور کلی گلبول‌های سفید ممانعت می‌کند. افراد مواجه‌شده با سولفورموستارد عوارض ریوی مشابه با بیماری انسدادی مزمن ریه (COPD) دارند. مطالعات نشان داده‌اند که در افراد مبتلا به COPD سطح ویتامین D کاهش یافته و تعداد پلاکت‌ها افزایش یافته است. از آنجاکه تاکنون میزان سرمی ویتامین D در این افراد گزارش نشده است. در این مطالعه، میزان سرمی ویتامین D و ارتباط آن با تعداد و درصد گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: شرکت‌کنندگان شامل ۱۰۰ نفر از افراد مواجه‌شده با گاز خردل با مشکلات ریوی و ۸۷ نفر از افراد سالم به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. سطح سرمی ویتامین D با متد الایزا و تعداد لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، گلبول‌های سفید، پلاکت‌ها با دستگاه سیسمکس به‌روش شمارش سلولی سنجش شد.

نتایج: میزان ویتامین D و درصد لنفوسیت‌ها در گروه مواجه‌شده با سولفورموستارد کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل ($P < 0.001$) داشته است. درحالی‌که تعداد نوتروفیل‌ها و گلبول‌های سفید در گروه مواجه‌شده افزایش معناداری داشته است و اما تعداد پلاکت‌ها اختلاف معناداری ($P = 0.083$) بین دو گروه نشان نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که افراد مواجه‌شده با سولفورموستارد، دچار اختلال تنظیم در ارتباط و همبستگی بین ویتامین D و سلول‌های سیستم ایمنی شده‌اند.

واژگان کلیدی: ویتامین D، سولفورموستارد، لنفوسیت‌ها، گلبول‌های سفید، نوتروفیل‌ها، پلاکت‌ها

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وسوم-شماره ۱۲۳
تیر ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۱

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۳/۰۴

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۲

مقدمه

می‌یابد. همچنین میزان پلاکت در بیماران مبتلا به COPD و بیماری‌های التهابی افزایش چشمگیری داشته است (۱۶-۱۷).

با توجه به موارد گفته شده، از یک سو در بیماری‌های التهابی مزمن ریوی از قبیل COPD که با کاهش میزان سرمی ویتامین D به دلیل بدعملکردی رسپتور ویتامین D و کاهش فعالیت تنظیم‌کننده‌های التهابی مواجه هستیم و از سوی دیگر، به دلیل اهمیت و ارتباط میزان ویتامین D با تعداد لنفوسیت‌ها، نوتروفیل، گلبول‌های سفید در پاسخ‌های التهابی و اینکه تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر سنجش میزان ویتامین D در افراد مواجه شده با سولفورمستارد وجود ندارد، لذا در این مطالعه، میزان سرمی ویتامین D، تعداد لنفوسیت‌ها، پلاکت‌ها نوتروفیل‌ها و گلبول‌های سفید در افراد مواجه شده با سولفورمستارد و با افراد سالم مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه که از نوع موردشاهد می‌باشد، ۱۰۰ نفر افراد مواجه شده با سولفورمستارد در گروه مورد و ۸۷ نفر افراد سالم به‌عنوان گروه شاهد، مورد مطالعه قرار گرفتند. این مطالعه به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش‌های علوم پزشکی در دانشگاه شاهد رسیده است. از افراد شرکت‌کننده در مطالعه، قبل از شرکت در مطالعه رضایت‌نامه کتبی گرفته شده است.

معیارهای ورود و خروج

مواجهه با گاز خردل و داشتن بیماری ریوی ناشی از آن برای گروه جانبا، سن افراد بین ۳۰ تا ۶۵ سال و عدم ابتلا به بیماری خاص که در روند مطالعات مداخله کند، برای هر دو گروه از جمله معیارهای ورود می‌باشد. همچنین در این مطالعه افراد شرکت‌کننده در دو گروه را مردان تشکیل می‌دهند. دریافت داروهای ایمنوساپرسیو و مکمل‌های ویتامین D، وجود بیماری‌های عفونی حاد و اختلال در متابولیسم ویتامین D از جمله معیارهای خروج

بعد از گذشت چندین سال از حمله شیمیایی عراق علیه ایران، افراد مواجه شده با گاز خردل (سولفورمستارد) از عوارض بالینی بلندمدت رنج می‌برند. سولفورمستارد یک عامل آلکیل‌کننده قوی با ویژگی‌های کارسینوژنیک، سایتوتوکسیک و موتاژنیک است که دارای آثار کوتاه‌مدت (حاد) و بلندمدت (تأخیری) بر چشم، پوست، سیستم عصبی و به‌خصوص ریه‌ها می‌باشد (۲،۱). گزارشات موجود نشان می‌دهد که تماس با سولفورمستارد می‌تواند باعث اختلال در سیستم ایمنی همورال و سلولی گردد (۳). عوارض و مشکلات تأخیری مشاهده شده در مصدومین نیز متأثر از این اختلال می‌باشد (۴-۶). عوارض ریوی بلندمدت گازخردل در بیماران مبتلا به COPD نیز گزارش شده است (۷). در همین راستا، ویتامین D علاوه بر نقش کلاسیک خود در حفظ کلسیم، با تعدیل فعالیت و میزان لنفوسیت‌ها همچنین تعدیل گلبول‌های سفید (WBC) و نوتروفیل‌ها در شرایط التهابی از واکنش التهابی بیش از حد سیستم ایمنی جلوگیری می‌کند (۸-۱۰). ویتامین D₃ طی مکانیسمی می‌تواند با مهار بیان فاکتورهای نسخه‌برداری التهابی از جمله NFAT، NFkB، منجر به کاهش سایتوکاین‌های التهابی مثل IL-23، IL-12 و افزایش سایتوکاین‌های ضدالتهابی مثل IL-10 بشود (۱۱،۱۲). از آنجاکه در افراد مبتلا به بیماری انسدادی ریه (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) رسپتور ویتامین D از هسته به سیتوپلاسم انتقال نمی‌یابد و به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو شاهد کاهش فعالیت هیستون دی‌استیلاز ۲ (HDAC2) در این افراد هستیم، در نتیجه تنظیم بیان فاکتور رونویسی NFkB و به دنبال آن تنظیم بیان سایتوکاین‌های التهابی اختلال ایجاد می‌شود (۱۳).

علاوه بر این، مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که کمبود ویتامین D در افراد مبتلا به COPD وجود دارد و با کاهش ویتامین D میزان فعالیت لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ترشح سایتوکاین‌های التهابی افزایش

از مطالعه می‌باشد.

بررسی بالینی

افرادی که در گروه بیمار قرار داشتند، توسط متخصصین ریه مورد معاینه بالینی قرار گرفتند و تست‌های اسپرومتری برای ایشان انجام گردید. همچنین سلامت عمومی افراد شرکت‌کننده در گروه کنترل توسط پزشک عمومی تأیید گردید.

نمونه‌گیری

به دلیل تغییر میزان ویتامین D در طول سال، از تمامی افراد در پاییز خون گرفته شد. نمونه‌گیری از افراد دو گروه در بیمارستان ساسان انجام گرفت.

پنج میلی‌لیتر خون لخته از هر فرد تهیه شد، نیم ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار داده شد، سپس با دور 1500rpm به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم آن جدا گردید و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در ویال‌های جداگانه تا زمان آزمایشات در منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش ویتامین D

میزان ویتامین D سرم با روش الیزا رقابتی طبق کیت 25OH vitamin D که از شرکت Bioactivediagnostic از کشور آلمان خریداری شده بود، سنجش گردید.

به‌طور خلاصه، هم‌زمان مقدار لازم از سرم افراد یا همان مقدار از غلظت‌های مختلف استاندارد با کونژوگه ویتامین D-بیوتین به ول‌هایی که با آنتی‌بادی ضد ویتامین D کوت شده اضافه کردیم و به مدت نود دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در طول انکوباسیون، مقدار ثابتی از کونژوگه ویتامین D-بیوتین با ویتامین D در هر نمونه سرمی استاندارد در اتصال به آنتی‌بادی ضد ویتامین D کوت‌شده در هر ول رقابت می‌کند. به دنبال انکوباسیون مرحله شست‌وشو انجام می‌شود و سپس مقدار مشخصی از استرپتاویدین-HRP (SA-HRP) به هر ول اضافه می‌گردد و به مدت سی دقیقه در تاریکی و حرارت آزمایشگاه انکوبه می‌کنیم. سپس شست‌وشو انجام می‌دهیم SA-HRP باند نشده حذف شده و در

مرحله بعد، محلول سوبسترای TMB به هر ول اضافه گردید و در دمای اتاق برای سی دقیقه انکوبه شد؛ سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله الیزاریدر مدل BioTek ساخت کشور آمریکا خوانده شد.

سنجش میزان گلبول‌های سفید (WBC)، لنفوسیت‌ها و پلاکت‌ها و نوتروفیل‌ها

از هر فرد پنج میلی‌لیتر خون گرفته شد و به لوله حاوی ضدانعقاد K2EDTA منتقل شد. همچنین از هر خون تهیه‌شده، یک لام خون محیطی آماده شد و شمارش سلولی (CELL COUNTER) با دستگاه SYSMEX مدل Kx21، ساخت شرکت SYSMEX انجام گردید. درصد سلول‌ها نیز با مطالعه لام‌های تهیه‌شده که با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شده بودند تعیین شد.

آنالیز آماری

یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار نمایش داده شد. مقایسه یافته‌ها بین دو گروه با استفاده از آزمون t مستقل (independent- t test) انجام شده است. همبستگی بین ویتامین D و متغیرهای هماتولوژیک با ضریب همبستگی پیرسون (Pearson correlation) بررسی گردید. برای حذف اثر مخدوش‌کنندگی سن از رابطه بین ویتامین D و متغیرهای هماتولوژیک از رگرسیون استفاده شد. در این آنالیز مقدار β استاندارد شده و معنی‌داری گزارش گردید. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS v22 انجام شد. میزان P value کمتر از ۰,۰۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

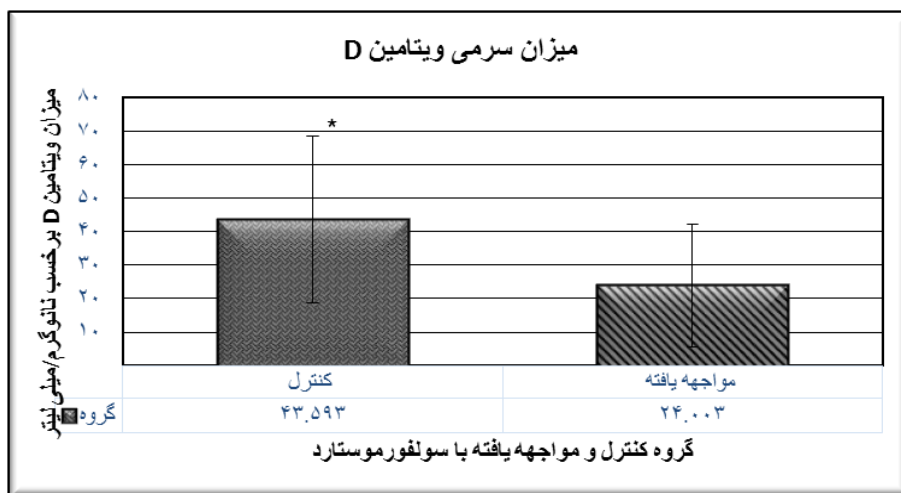
مشخصات دموگرافیک افراد در جدول شماره یک آورده شده است (جدول شماره ۱).

جدول ۱. جدول مشخصات دموگرافیک افراد

مورد مطالعه

مشخصات	گروه شاهد	گروه مواجهه
تعداد	۸۷	۱۰۰
سن (سال)	۴۲,۰۵±۶,۰۷	۵۰,۰۴±۷
جنس	مذکر	مذکر

همان طور که در نمودار شماره ۱ مشاهده می شود، سولفورموستارد به طور چشمگیری نسبت به افراد گروه میزان سرمی ویتامین D در افراد مواجه شده با کنترل کمتر است ($P < 0.0001$) (نمودار ۱).



نمودار ۱. میزان سرمی ویتامین D در گروه مورد و شاهد.

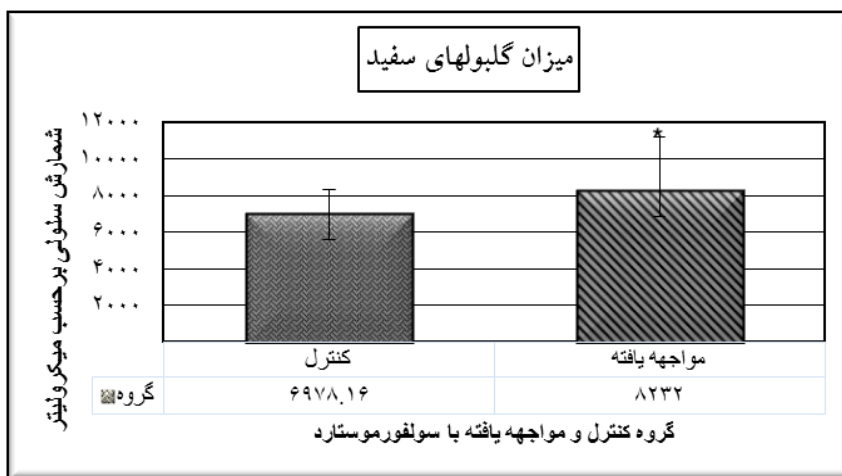
میزان سرمی ویتامین D به روش الیزا رقابتی سنجش گردید.

کنترل نشان می دهد ($P < 0.0001$) و تعداد پلاکت ها در افراد مواجه شده با سولفورموستارد بیش از افراد کنترل است، اما تفاوت معناداری بین دو گروه مشاهده نمی شود ($P = 0.083$) (جدول شماره ۲) (نمودار ۲-۵).

همان طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می کنید، تعداد گلبول های سفید و درصد نوتروفیل ها در افراد مواجه شده با سولفورموستارد در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشته است ($P < 0.0001$) در حالی که درصد لنفوسیت ها کاهش معناداری را در مقایسه با گروه

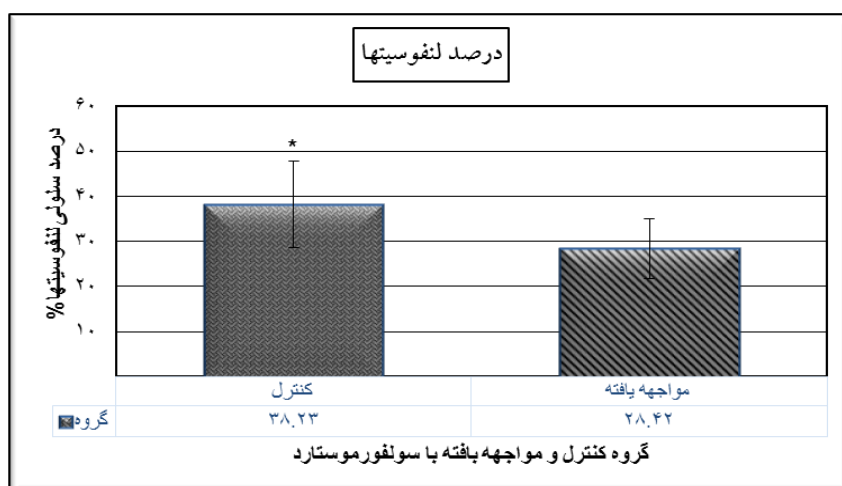
جدول ۲. تعداد گلبول های سفید و پلاکت ها و درصد لنفوسیت ها و نوتروفیل ها

	گروه				P-value
	مواجهه با سولفورموستارد (n=100)		کنترل (n=87)		
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
گلبول سفید (شمارش سلولی در میلی متر مکعب)	۸۲۳۲	۲۹۹۵.۴۵	۶۹۷۸.۱۶	۱۳۶۸.۰۳	۰.۰۰۰۱
پلاکت (شمارش سلولی در میلی متر مکعب)	۲۴۵۴۳۰	۵۶۷۴۷.۷۶	۲۳۰۷۹۳.۱۰	۵۸۰۵۶.۵۴	۰.۰۰۸۳
نوتروفیل %	۶۳.۲۶	۱۰.۳۴	۵۲.۲۲	۷.۱۴	۰.۰۰۰۱
لنفوسیت %	۲۸.۴۲	۹.۵۹	۳۸.۲۳	۶.۵۸	۰.۰۰۰۱



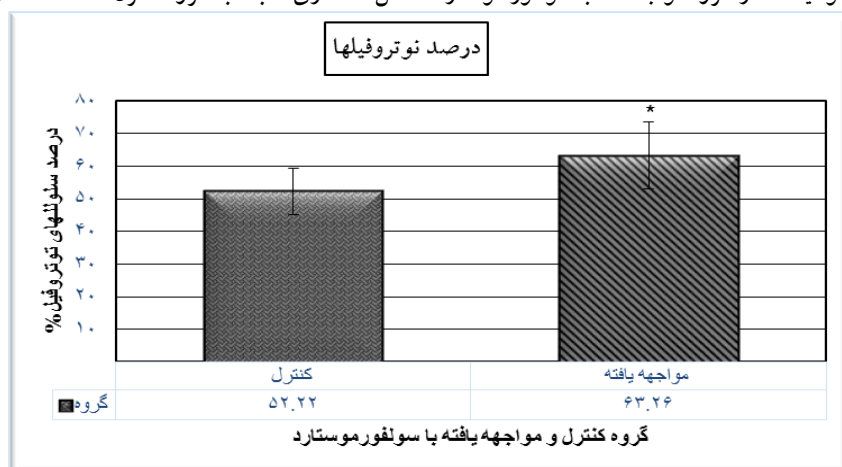
نمودار ۲. مقایسه تعداد گلبولهای سفید در گروه مورد و شاهد.

تعداد گلبولهای سفید با افزایش معناداری در گروه مورد نسبت به گروه کنترل همراه بوده است.



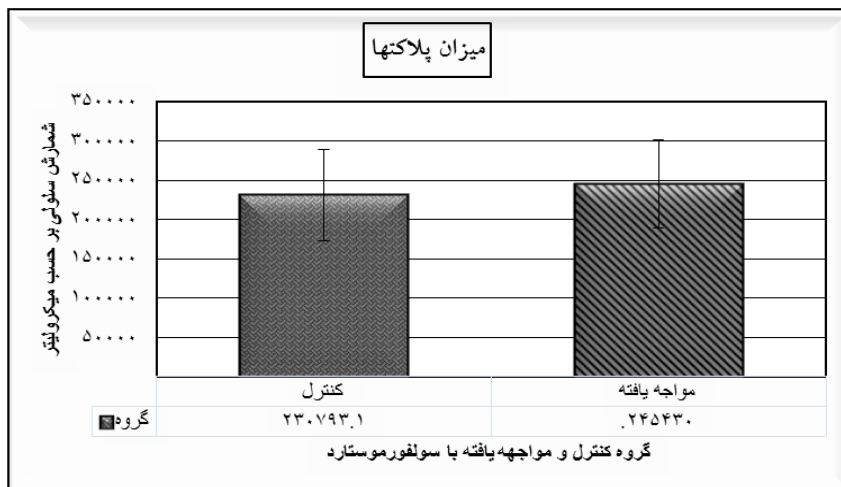
نمودار ۳. مقایسه درصد لنفوسیتها در گروه مورد و شاهد.

میزان درصد لنفوسیتها در گروه مواجهه شده با سولفورموستارد کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشته است ($P < 0.001$).



نمودار ۴. مقایسه درصد نوتروفیل در گروه مورد و شاهد.

میزان درصد نوتروفیلها در گروه مورد نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان داده است ($P < 0.001$).



نمودار ۵. مقایسه میزان سلولهای پلاکت در دو گروه مورد و شاهد.

میزان سلولهای پلاکت در دو گروه افزایش معناداری نشان نداده است ($P < 0.083$).

نتایج همبستگی

سولفورموستارد ارتباط معناداری مشاهده نشد ($\beta = 0.063$ و $P = 0.536$)، ($r = 0.056$ و $P = 0.583$) (جدول شماره ۳).

در حالی که غلظت سرمی ویتامین D با درصد لنفوسیتها در گروه کنترل ارتباط معنادار و همبستگی منفی وجود دارد، ($r = -0.263$ و $P = 0.014$)، ($\beta = -0.262$ و $P = 0.015$)، ولی در گروه مواجه شده با

جدول ۳. میزان همبستگی غلظت سرمی ویتامین D با تعداد گلبولهای سفید، پلاکتها و درصد لنفوسیتها، نوتروفیلها

	غلظت ویتامین D (ng/ml)							
	گروه مواجهه یافته با سولفورموستارد				گروه کنترل			
	Pearson Correlation	P-value	β -coefficient	P-value	Pearson Correlation	P-value	β -coefficient	P-value
گلبول سفید (شمارش سلولی در میلی متر مکعب)	۰.۱۰۹	۰.۲۸۰	۰.۱۰۵	۰.۲۹۶	-۰.۱۱۲	۰.۳۰۳	-۰.۱۰۹	۰.۳۱۸
پلاکت (شمارش سلولی در میلی متر مکعب)	۰.۰۵۵	۰.۵۸۲	-۰.۰۵۴	۰.۵۹۵	۰.۱۳۱	۰.۲۲۸	۰.۰۴۷	۰.۶۶۳
نوتروفیل %	-۰.۰۸۴	۰.۴۰۳	۰.۰۹۷	۰.۳۴۱	۰.۲۵۱	۰.۰۱۹	۰.۲۵۶	۰.۰۱۸
لنفوسیت %	۰.۰۵۶	۰.۵۸۳	۰.۰۶۳	۰.۵۳۶	-۰.۲۶۳	۰.۰۱۴	۰.۲۶۲	۰.۰۱۵

($\beta = 0.097$ و $P = 0.341$) ($r = -0.084$ و $P = 0.403$)
 نتایج حاصل از بررسی میزان گلبولهای سفید نشان داد که میزان این سلولها در گروه کنترل ارتباط معناداری با میزان سرمی ویتامین D نداشته است ($\beta = -0.109$ و $P = 0.318$)، ($r = -0.112$ و $P = 0.303$)

همین طور نتایج نشان می دهد که درصد سلولهای نوتروفیل ارتباط معنادار و مثبت با میزان سرمی ویتامین D در گروه کنترل دارد ($r = 0.251$ و $P = 0.019$)، ($\beta = 0.256$ و $P = 0.018$) اما در گروه مواجه شده با سولفورموستارد ارتباط معناداری مشاهده نشد

تهران، بر روی میانگین سطح ویتامین D در افراد سالم و بیماران مبتلا به دیابت نوع دو، مطالعه‌ای انجام داده‌اند. در این مطالعه میانگین میزان سرمی ویتامین D در افراد مبتلا به دیابت ۰.۵۹٪ دچار کمبود ویتامین D و ۰.۲۷٪ از نظر ویتامین D ناکافی گزارش کرده‌اند. این میزان در افراد سالم به ترتیب ۰.۴۷٪ و ۰.۲۴٪ بود که نشان از میزان بالای شیوع کمبود ویتامین D در افراد گروه مورد نسبت به کنترل می‌باشد (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر در شاهرود، ابراهیمی و همکاران، گروهی تعداد ۱۰۴۷ نفر از دانش‌آموزان دختر و پسر را در مقطع دبیرستان مورد بررسی قرار دادند که از این بین شیوع کمبود ویتامین D در پسران ۰.۲۴۰۷٪ میزان ناکافی ویتامین D، ۰.۳۲۰۲٪ و میزان نرمال ویتامین D، ۰.۳۳۰۱٪ می‌باشد. همچنین در دختران میزان ۰.۸۷۰۹٪ کمبود ویتامین D، ۰.۵۰۰۵٪ میزان ناکافی ویتامین D و ۰.۶۰۰۶٪ از نظر میزان ویتامین D کافی بودند (۲۱). رهنورد و همکاران در تهران، شیراز، تبریز و بوشهر، مطالعه‌ای بر روی کمبود ویتامین D در ایرانیان مبتلا به استئوپوروزیس و افراد سالم پرداختند که در این میان بیشترین میزان ویتامین D را شهر بوشهر داشت. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که شرایط جغرافیایی با میانگین میزان سرمی ویتامین D ارتباط معناداری دارد. همچنین میزان سرمی ویتامین D ارتباط معناداری با فعالیت فیزیکی افراد و در معرض قرارگیری صورت و پوست با نور خورشید ندارد. میزان میانگین سرمی ویتامین D را در مردان سالم گروه کنترل را بالای ۳۵ng/ml (mildinsufficiency)، ۲۵ng/ml کمبود ویتامین D و کمتر از ۱۲۰۵ng/ml را کمبود شدید ویتامین D در نظر گرفتند (۱۹).

Arroyo و همکاران، در سال ۲۰۰۳ تأثیر 1,25OH₂D₃ را بر روی القای ترشح سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 در سلول‌های پوستی فیروبلاست و کراتینوسیت‌ها توسط سولفورموستارد بررسی کردند که نتایج نشان داد میزان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 که به واسطه سولفورموستارد افزایش پیدا کرده بود، به وسیله تیمار با 1,25OH₂D₃

همچنین در گروه مواجهه‌یافته با سولفورموستارد نیز ارتباط معناداری با میزان سرمی ویتامین D وجود نداشت (P=۰,۲۸۰ و r=۰,۱۰۹)، (P=۰,۲۹۶ و β=۰,۱۰۵).

میزان پلاکت‌ها در گروه کنترل با میزان سرمی ویتامین D ارتباط معناداری نداشت (P=۰,۲۲۸ و r=۰,۱۳۱)، (P=۰,۶۶۳ و β=۰,۰۴۷). همچنین در گروه مواجهه‌یافته با سولفورموستارد نیز این ارتباط معنادار نبود (P=۰,۵۸۲ و r=-۰,۰۵۵)، (P=۰,۵۹۵ و β=-۰,۰۵۴).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات بسیاری نشان داده است که ویتامین D دارای نقش کلاسیک در جذب کلسیم از روده و کلیه‌ها می‌باشد (۱۸). اما نقش غیرکلاسیک آن شامل سرکوب التهاب با مداخله در مکانیسم‌های سیستم ایمنی همچون سرکوب فاکتورهای رونویسی سایتوکاین‌های التهابی مثل NFκB و تعدیل پاسخ‌های التهابی با تأثیر بر سلول‌های سیستم ایمنی از قبیل لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها و به‌طورکلی کاهش گلبول‌های سفید (WBC) می‌باشد (۸). در مطالعه حاضر نشان داده شده است که غلظت سرمی ویتامین D گروه کنترل در میزان نرمال قرار دارد. میزان سرمی ویتامین D بین دو گروه کنترل و مواجهه‌شده با سولفورموستارد اختلاف معناداری وجود دارد. بدین صورت که میزان سرمی ویتامین D در افراد گروه بیمار به‌طور چشمگیری کمتر از گروه کنترل است. برخی مطالعات نشان داده است که کمبود ویتامین D با افزایش میانگین پلاکت‌ها همراه می‌باشد (۱۴). همان‌طور که گفته شد مطالعات بسیاری نشان داده است که میزان ویتامین D در افراد مبتلا به انسدادی ریه (COPD) کاهش پیدا کرده است (۱۶). همچنین مطالعات نشان داده است که کلسیم نیز می‌تواند در کاهش التهاب نقش داشته باشند (۱۷).

در مطالعه‌ای که در ایران انجام شده، میانگین غلظت سرمی ویتامین D کمتر از ۲۵ ng/ml به‌عنوان کمبود ویتامین D و بین ۲۵ تا ۳۰ng/ml به‌عنوان میزان ناکافی در نظر گرفته شده است (۱۹). جلالی و همکاران در

T در مجاورت ویتامین D انجام داده‌اند، به این نتیجه رسیدند که ویتامین D با مهار ترشح سایتوکاین IL-2 موجب سرکوب تکثیر سلول‌های لنفوسیت T می‌شوند (۲۶). مطالعات دیگری نشان دادند که ویتامین D از طریق افزایش تمایز لنفوسیت‌های T تنظیمی می‌تواند موجب سرکوب تکثیر لنفوسیت‌های Th1 شود (۲۷).

عبدالعزیز عبدالراشد و همکاران در مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به آترواسکلروزیس به ارزیابی شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها پرداختند که نشان دادند افراد مبتلا به آترواسکلروزیس که به بیماری مزمن periodontitis مبتلا هستند با افزایش معنادار شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت مواجه می‌باشند (۲۸). در همین راستا، Li و همکاران در مطالعه‌ای بر روی موش‌های دیابتی مبتلا به periodontitis با تیمارکردن ویتامین D، به این نتیجه رسیدند که ویتامین D از طریق کاهش پاسخ‌های التهابی توانسته است بیماری periodontitis را بهبود ببخشد (۸). Zhang و همکاران در مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به COPD نشان داد که میزان پلاکت با افزایش وخامت افزایش یافته است و به این نتیجه رسیدند که میزان پلاکت می‌تواند مارکر قابل‌اتکایی برای پیشرفت بیماری COPD باشد (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر بر روی سلول‌های نوتروفیل و ارتباط آن با ویتامین D، Takahashi و همکاران از ژاپن به این نتیجه رسیدند که ویتامین D در بیماری‌های التهابی می‌تواند با سرکوب بیان Trappin-2 از ترشح بیش از حد مدیاتورها و سایتوکاین‌های التهابی نوتروفیل جلوگیری کند. در واقع آن‌ها نشان دادند که نوتروفیل‌ها رسپتور ویتامین D را بیان می‌کنند (۹).

در ادامه، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داده است که درصد لنفوسیت‌ها با میزان سرمی ویتامین D در گروه کنترل ارتباط معنادار و منفی دارد که با مطالعات سایرین همخوانی دارد. حال آنکه در گروه مواجه شده با سولفورموستارد این ارتباط معنادار نیست. همچنین درصد نوتروفیل‌ها با میزان سرمی ویتامین D ارتباط معنادار مثبت در گروه کنترل دارد که با مطالعات

میزان ترشح آن به‌طور چشمگیری کاهش پیدا کرده است. نتایج مطالعه این محقق نشان می‌دهد که $1,25\text{OH}_2\text{D}_3$ می‌تواند به‌عنوان یک عامل ایمنومدولاتور در جهت تعدیل سایتوکاین‌های IL-6 و IL-8 به تنظیم پاسخ‌های التهابی سیستم ایمنی کمک کند (۲۲).

Persson و همکاران بر روی میزان سرمی ویتامین D و ارتباط آن با عملکرد حیاتی ریه (FVC) در افراد مبتلا به COPD مطالعه داشتند که نشان دادند کمبود ویتامین D با افزایش سایتوکاین‌های التهابی و استعداد به عفونت‌های ریوی و کاهش FVC در ارتباط می‌باشد (۲۳). همچنین در مطالعه‌ای Janssens و همکاران نشان دادند که ارتباط معناداری بین شیوع بالای کمبود سرمی ویتامین D در افراد مبتلا به COPD وجود دارد؛ همچنین نشان دادند که ارتباط روشنی بین کمبود ویتامین D و عملکرد حیاتی ریه وجود دارد (۲۴). در مطالعه دیگری Barker و همکاران بر روی ارتباط بین ویتامین D و ترشح سایتوکاین‌های التهابی تمرکز کردند که آشکار کردند افراد مبتلا به COPD با کمبود ویتامین D میزان بیشتری از سایتوکاین‌های التهابی همچون TNF α و IL-1 β را ترشح می‌کنند (۲۵). همان‌طور که گفته شد، میزان ویتامین D در افراد مواجه شده با سولفورموستارد که عوارض ریوی مشابه با بیماران مبتلا به COPD دارند، نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است که با مطالعه سایرین مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای Zue و همکاران نشان دادند که میزان سرمی کلسیم و کلسیم موجود در رژیم غذایی موجب کاهش التهاب شده است؛ همچنین کلسیم در ترکیب با ویتامین D به‌طور هم‌افزایی منجر به سرکوب بیان سایتوکاین‌های التهابی TNF α می‌شود (۱۷).

همچنین در مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که میزان ویتامین D با افزایش ترشح سایتوکاین‌های ضدالتهابی موجب تعدیل سلول‌های لنفوسیت می‌شوند. Bhalal AK و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی طحال و تیموس موش با هدف ارزیابی پاسخ‌های تکثیری سلول‌های لنفوسیت

بیش از حد التهاب جلوگیری کند. در افراد مواجهه شده با سولفورموستارد با مشکلات ریوی نیز کمبود ویتامین D موجب التهاب شده است. ولی ارتباط بین ویتامین D و سلولهای التهابی بهم خورده است.

ادامه مطالعات بیشتری بر روی رسپتور ویتامین D و پلی مورفسیم حامل ویتامین D (Vitamin D binding protein) و همچنین ارتباط آن با میزان کلسیم و سایتوکاینهای التهابی مورد نیاز است تا بتوان به نتایج کامل تری در این رابطه رسید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در مرکز تحقیقات تنظیم پاسخهای ایمنی دانشگاه شاهد و با حمایت‌های مالی آن مرکز صورت پذیرفت. در پایان صمیمانه از تمام کسانی که در این مطالعه شرکت داشتند تشکر می‌کنیم.

منابع

1. Dacre JC, Goldman M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacological reviews*. 1996;48 (2):289-326.
2. Ghanei M, Vosoghi AA. An epidemiologic study to screen for chronic myelocytic leukemia in war victims exposed to mustard gas. *Environmental health perspectives*. 2002;110 (5):519.
3. Bobb AJ, Arfsten DP, Jederberg WW. N-acetyl-L-cysteine as prophylaxis against sulfur mustard. *Military medicine*. 2005;170 (1):52.
4. Balali-Mood M, Hefazi M. Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2006;99 (4):273-82.
5. Javadi M-A, Yazdani S, Sajjadi H, Jadidi K, Karimian F, Einollahi B, et al. Chronic and delayed-onset mustard gas keratitis: report of 48 patients and review of literature. *Ophthalmology*. 2005;112 (4):617-25. e2.
6. Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D. Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *Journal of occupational and environmental medicine*. 2003;45 (11):1136-43.
7. Shahriary A, Mehrani H, Ghanei M, Parvin S. Comparative proteome analysis of peripheral neutrophils from sulfur mustard-exposed and COPD patients. *Journal of immunotoxicology*. 2015;12 (2):132-9.

سایرین همخوانی دارد؛ اما در گروه مواجهه شده با سولفورموستارد این ارتباط وجود ندارد. در ارتباط با گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها، ارتباط معناداری با میزان سرمی ویتامین D در دو گروه نشان داده نشد؛ این در حالی است که در افراد مواجهه یافته با گاز خردل میزان ویتامین D کمتر همراه با افزایش گلبول‌های سفید و پلاکت‌هاست که با وخامت بیماری و درگیری مشابه با COPD آن‌ها همخوانی دارد. احتمالاً آلودگی با سولفورموستارد مانع اثر تنظیمی ویتامین D بر روی درصد لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها شده است؛ در نتیجه التهاب در آنان همچنان ادامه دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه هماهنگ با مطالعه سایرین نشان می‌دهد که در افراد نرمال ویتامین D با نقش تنظیمی خود بر روی سلول‌های سیستم ایمنی می‌تواند به‌عنوان یک عامل ایمونومدولاتور از افزایش

8. Khoo AL, Joosten I, Michels M, Woestenenk R, Preijers F, He XH, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Immunology*. 2011;134 (4):459-68.
9. Li H, Xie H, Fu M, Li W, Guo B, Ding Y, et al. 25-hydroxyvitamin D3 ameliorates periodontitis by modulating the expression of inflammation-associated factors in diabetic mice. *Steroids*. 2013;78 (2):115-20.
10. Takahashi K, Nakayama Y, Horiuchi H, Ohta T, Komoriya K, Ohmori H, et al. HUMAN NEUTROPHILS EXPRESS MESSENGER RNA OF VITAMIN D RECEPTOR AND RESPOND TO 1 α , 25-DIHYDROXYVITAMIN D3. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2002;24 (3):335-47.
11. Gynther P, Toropainen S, Matilainen JM, Seuter S, Carlberg C, Väisänen S. Mechanism of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D 3-dependent repression of interleukin-12B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2011;1813 (5):810-8.
12. Trochoutsou A, Kloukina V, Samitas K, Xanthou G. Vitamin-D in the immune system: genomic and non-genomic actions. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2015.
13. Barnes PJ. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. *Annual review of physiology*. 2009;71:451-64.

14. Cumhuri Cure M, Cure E, Yuce S, Yazici T, Karakoyun I, Efe H. Mean platelet volume and vitamin D level. *Annals of laboratory medicine*. 2014;34 (2):98-103.
15. Ferrari M, Schenk K, Papadopoulou C, Ferrari P, Dalle Carbonare L, Bertoldo F. Serum 25-hydroxy vitamin D and exercise capacity in COPD. *Thorax*. 2011;66 (6):544-5.
16. Finklea JD, Grossmann RE, Tangpricha V. Vitamin D and chronic lung disease: a review of molecular mechanisms and clinical studies. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2011;2 (3):244-53.
17. Zhu Y, Mahon BD, Froicu M, Cantorna MT. Calcium and $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 target the TNF- α pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *European journal of immunology*. 2005;35 (1):217-24.
18. Ginanjar E, Setiati S, Setiyohadi B. Vitamin D and autoimmune disease. *Acta Medica Indonesiana*. 2006;39 (3):133-41.
19. Rahnavard Z, Eyboosh S, Homami MR, Meybodi HA, Azemati B, Heshmat R, et al. Vitamin d deficiency in healthy male population: results of the Iranian multi-center osteoporosis study. *Iranian journal of public health*. 2010;39 (3):45-52.
20. Djalali M, Taheri E, Saedisomeolia A, Djazayeri A, Rahemi A, Hashemi M, et al. Vitamin D status of type 2 diabetic patients compared with healthy subjects in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit*. 2014;19 Suppl 3:S6-s11.
21. Ebrahimi M, Khashayar P, Keshtkar A, Etemad K, Dini M, Mohammadi Z, et al. Prevalence of vitamin D deficiency among Iranian adolescents. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. 2014;27 (7-8):595-602.
22. Arroyo CM, Kan RK, Burman DL, Kahler DW, Nelson MR, Corun CM, et al. Regulation of $1-\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D3 on Interleukin-6 and Interleukin-8 Induced by Sulfur Mustard (HD) on Human Skin Cells*. *Pharmacology & toxicology*. 2003;92 (5):204-13.
23. Persson LJP, Aanerud M, Hiemstra PS, Hardie JA, Bakke PS, Eagan TML. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with low levels of vitamin D. 2012.
24. Janssens W, Bouillon R, Claes B, Carremans C, Lehouck A, Buysschaert I, et al. Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. *Thorax*. 2010;65 (3):215-20.
25. Barker T, Martins TB, Hill HR, Kjeldsberg CR, Dixon BM, Schneider ED, et al. Circulating pro-inflammatory cytokines are elevated and peak power output correlates with 25-hydroxyvitamin D in vitamin D insufficient adults. *European journal of applied physiology*. 2013;113 (6):1523-34.
26. Bhalla AK, Amento EP, Serog B, Glimcher LH. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1984;133 (4):1748-54.
27. Khoo AL, Joosten I, Michels M, Woestenenk R, Preijers F, He XH, et al. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation but not the suppressive function of regulatory T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Immunology*. 2011;134 (4):459-68.
28. Al-Rasheed A. Elevation of white blood cells and platelet counts in patients having chronic periodontitis. *The Saudi dental journal*. 2012;24 (1):17-21.
29. Zhang M, Li Y, Zhang J, Zhang Q, Yang X, Shan H, et al. Mean platelet volume is elevated in exacerbated and convalescent COPD patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;451 (Pt B):227-31.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
23rd Year, No.123
June- July, 2016*

Received: 20/04/2016

Last revised: 24/05/2016

Accepted: 01/06/2016

Serum level of vitamin D reduces in sulfur mustard-exposed individuals with long-term pulmonary complications

Muhammad Mehdi Adibzadeh¹, Tooba Ghazanfari^{2*}, Susan Ardestani³, Soghrat Faghihzadeh⁴

1. Faculty of Immunology, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Faculty of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran.
4. Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical sciences, Zanjan, Iran.

*Corresponding author e-mail: ghazanfari@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Vitamin D as an immunomodulatory agent is an effective factor to suppress inflammatory responses. It is shown that serum level of vitamin D reduces in people with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In addition, some studies have shown that vitamin D modulates white blood cells (WBC) and lymphocytes, especially in inflammatory disease. Moreover, WBC and platelets increase in people with periodontitis as an inflammatory disease. In the present study, serum level of vitamin D and its correlation with lymphocyte, platelet, neutrophils and WBC count were investigated in sulfur mustard (SM)- exposed individuals in comparison with healthy control group.

Materials and Methods: Participants were 100 SM-exposed individuals with pulmonary complications and 87 unexposed as control group. Serum level of vitamin D was measured by ELISA and lymphocyte, platelet, neutrophil cells and white blood cells were measured by cell counter method.

Results: The results showed that the serum level of vitamin D decreases in SM-exposed individuals ($P < 0.001$). White blood cells and neutrophils significantly increase in SM-exposed group as compared to control group ($P < 0.001$). Lymphocyte cells reduce in SM-exposed group ($P < 0.001$). But percentage of platelet cells showed no differences between the two groups ($P = 0.083$). Also, there was a correlation between serum level of vitamin D and lymphocyte cells and also between neutrophils and serum level of vitamin D ($P < 0.05$).

Conclusion: This study revealed that SM-exposed individuals with pulmonary complication have deregulation in relation to vitamin D and immune system components.

Keywords: Vitamin D, Sulfur mustard, lymphocytes, white blood cells, neutrophils, Platelets