

بررسی درصد سلول‌های Treg در خون محیطی افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد در مقایسه با افراد سالم

نویسندگان: نفیسه زند^۱، طوبی غضنفری*^۲، محمود بزرگمهر^۳، علیرضا ثابت‌پور^۴،
سقراط فقیه‌زاده^۵

۱. گروه ایمنونولوژی، 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
۴. فوق تخصص ریه، کالج سلطنتی متخصصان داخلی، لندن، انگلستان
۵. گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

* نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های T تنظیمی (Treg) از زیرگروه‌های لنفوسیت‌ها هستند که با مکانیسم‌های وابسته به تماس سلولی و ترشح عوامل محلول باعث کنترل التهاب و برقراری هموستاز می‌شوند. با توجه به این‌که در افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد عدم تعادل سلول‌های ایمنی و اختلال در هموستاز وجود دارد، در مطالعه حاضر درصد سلول‌های Treg با مارکرهای CD4, CD25, CD127, FOXP3 در خون محیطی افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد در مقایسه با گروه 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. بررسی‌های بالینی گروه مورد توسط پزشکان فوق تخصص ریه و اسپیرومتری، توسط اپراتور تست ریه انجام شد. پس از جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی درصد سلول‌های Treg با روش فلوسایتومتری 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 ریوی خفیف هیچ تفاوتی از لحاظ درصد سلول‌های Treg با افراد سالم وجود ندارد و برای درک نقش این سلول‌ها در عوارض ریوی این بیماران مطالعات بیشتری لازم است.

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

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

مقدمه

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 کاهش یافته است (۸).

در این خصوص، ایمانی و همکاران در ۲۰۱۶ 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 افزایش یافته است (۷). در مطالعه دیگری، ایمانی و همکاران در ۲۰۱۶، با سنجش بیان مارکرهای FOXP3 و IL-10 در بافت بیوپسی transbronchial نشان دادند که در مصدومین شیمیایی بیان این مارکرها نسبت افراد مبتلابه COPD و افراد کنترل سالم کاهش یافته 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 مارکرهای CD4، CD25، CD127 و FOXP3 اندازه‌گیری نماییم.

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه که از نوع مورد شاهد می‌باشد، حجم نمونه مورد نیاز، بر اساس اطلاعات به دست آمده از مطالعه ایمانی و همکاران تعیین شده است (۷). در این مطالعه درصد سلول‌های CD4+FOXP3+ در گروه کنترل ۱.۲۱±۰.۹۴ و در گروه جانبازان ۲.۶۶±۰.۷۱/۸ بوده است. با در نظر گرفتن خطای ۵٪ و توان ۹۵٪ با کمک فرمول زیر و با احتساب بزرگ‌ترین انحراف معیار، ۱۲ نفر مواجهه یافته با سولفورموستارد که دارای عوارض ریوی

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 قرار گرفته 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 به‌طوری که SM می‌تواند اثرات و عوارضی درازمدت حتی ۴۰ 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، فیروز ریوی و پیگمانتاسیون غیرطبیعی پوست، انواع سرطان‌ها، بیماری زخم قرنیه عودکننده و کونژوکتویت مزمن رنج می‌برند. مطالعه کوهورت سردشت ایران نشان می‌دهد که ۲۰-۱۶ سال پس از مواجهه با گاز خردل در حدود ۸۰٪ از افراد مواجهه یافته علائم (Chronic obstructive pulmonary disease) از جمله سرفه، تولید خلط، تنگی نفس، درد سینه و دیس پنه شبانه را بروز می‌دهند (۲). علی‌رغم مطالعات سلولی و مولکولی انجام شده مکانیسم آسیب‌های مزمن ناشی از مواجهه با SM هنوز شناخته‌نشده است. به‌طورکلی مطالعات انجام شده در مصدومین شیمیایی حاکی از تغییر در بیان سایتوکاین‌های التهابی و سایتوکاین‌های پروفیبروتیک مانند IL-17، IL-10، IL-8، IL-6، IL-1β، TGF-β1، TNF-α و تغییر در سلول‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی مانند NK، T cytotoxic cells، Th17 نسبت به گروه کنترل می‌باشد (۳).

۴، ۵، ۶، 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، از یک طرف در حفظ تولرانس محیطی و کاهش التهاب نقش دارند و از طرف دیگر با

تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شد. سپس با اضافه کردن ۲mL بافر رنگ‌آمیزی به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰g سانتی‌فوژ شده بعد از خالی کردن مایع رویی این مرحله دوباره تکرار شد. به منظور ایمنونوفلوروسانس سلول‌ها به میزان یک میلیون 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 به دست آمده است) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال ۴ درجه در تاریکی انکوبه گردید. سپس با ۲mL بافر رنگ‌آمیزی در دمای ۶ درجه به مدت ۶ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتی‌فوژ شده و پس از تخلیه مایع رویی، با ۱mL بافر فیکس/پریم به مدت ۴۰ دقیقه در یخچال ۴ درجه در تاریکی انکوبه شد. پس از اضافه کردن ۱mL بافر پریم/واش در دمای ۶ درجه به مدت ۶ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتی‌فوژ انجام شده و پس از خالی کردن مایع رویی، مجدداً با اضافه کردن ۲mL بافر پریم/واش در دمای ۶ درجه به مدت ۶ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتی‌فوژ انجام شده و پس از خالی کردن مایع رویی، ۲۰ لامبدا آنتی‌بادی ضد FOXP3 و ۸۰ لامبدا بافر پریم/واش به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت ۴۰ دقیقه در یخچال ۴ درجه در تاریکی انکوبه شد. سپس با افزودن ۲mL بافر پریم/واش در دمای ۶ درجه به مدت ۶ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتی‌فوژ کرده و پس از خالی کردن مایع رویی، مجدداً با افزودن ۲mL بافر پریم/واش در دمای ۶ درجه به مدت ۶ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتی‌فوژ کرده و پس از خالی کردن مایع رویی در ۳۵۰ لامبدا بافر رنگ‌آمیزی خوانش با دستگاه فلوسایتومتر Attune next (Thermo Fisher, USA) 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

بودند در گروه مورد و ۱۲ نفر افراد سالم به عنوان گروه کنترل مورد مطالعه قرار گرفتند.

$$N = \frac{2S_1^2}{\Delta^2} (Z_\alpha + Z_\beta)^2 \quad N = \frac{2 \times (1/96 + 1/64)^2}{(8/71 - 4/90)^2} = 12$$

این مطالعه با کد IR Shahed.REC.13961218 در هشتمین جلسه کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۶ مصوب گردیده است.

معیارهای ورود به مطالعه برای گروه مورد شامل کسانی است که بر اساس تأیید کمیسیون پزشکی جانبازان، شیمیایی تلقی شده‌اند و دارای مشکلات ریوی هستند. رضایت فردی برای ورود به مطالعه داشته‌اند سن افراد بین ۳۵ تا ۶۵ 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 بیماری‌های زمینه‌ای 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

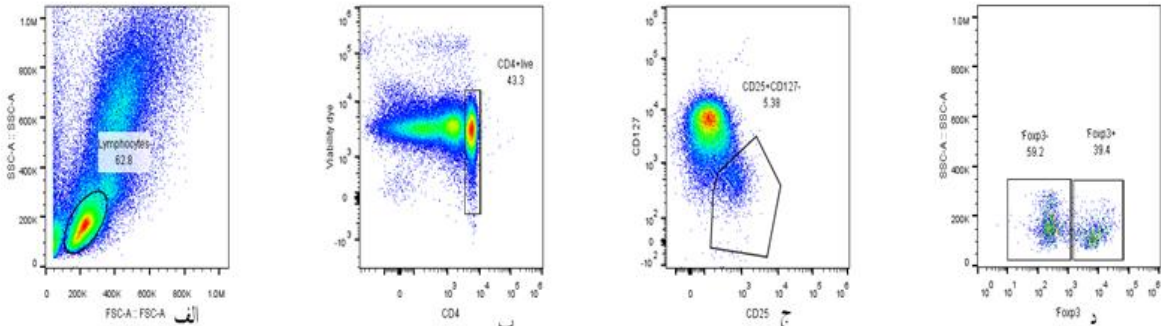
۲/۵ mL خون سیاهرگی از افراد تحت آزمایش، در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA -k3 جمع‌آوری شد.

رنگ‌آمیزی

ابتدا سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) به روش گرادیان غلظت فایکول (Inotrain, Germany) جداسازی شد و به منظور تعیین حیات سلول‌ها (viability) به مقدار ۱ لامبدا از رنگ Fixable viability stain 780 (BD Bioscience, San Jose, CA) به یک میلیون سلول در ۱mL PBS اضافه شد و سپس ۱۵ دقیقه در

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.

سلول‌هایی که از نظر مارکر CD127 منفی و از نظر مارکر CD25 مثبت بودند انتخاب شدند. در میان سلول‌هایی که CD25+CD127- بودند آن‌هایی که FOXP3 را بیان



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

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

نتایج

طبق جدول شماره ۱، از لحاظ 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 اسپرومتری و درصد سلول‌های Treg در افراد مواجهه یافته با سولفورموستارد، همبستگی معنی‌داری مشاهده نگردید.

بررسی‌های آماری

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

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

P-value	انحراف معیار	میانگین (%)	تعداد	گروه	
				کنترل	درصد سلول‌های CD4+CD25+CD127-FOXP3+
۰.۰۷۶	۰/۸۳	۱/۴۲	۱۲	کنترل	درصد سلول‌های CD4+CD25+CD127-FOXP3+
	۰.۰۴۷	۱.۰۵۱	۱۲	مواجهه یافته	
۰.۰۴۱۳	۲.۰۲	۳.۷۴	۱۲	کنترل	درصد سلول‌های CD4+CD25+CD127-
	۱.۰۶۹	۴.۳۸	۱۲	مواجهه یافته	

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

FEV1/FVC		FEV1		FVC		
p	r	p	R	p	R	
۰/۹۸۷	۰.۰۰۰۵	۰/۸۵۷	۰.۰۰۶۲	۰/۸۲۵	۰.۰۰۷۶	٪ CD4+CD25+CD127-FOXP3+
۰/۸۴۶	۰.۰۰۵۹	۰/۷۰۴	۰.۰۱۳	۰/۷۸۳	۰.۰۰۹۴	٪ CD4+CD25+CD127-

P=P-value

r = Spearman's correlation coefficient

بحث و نتیجه گیری

سلول های Treg در کنترل التهاب و هموستاز با ترشح عوامل محلول و یا توسط مکانیسم های وابسته به تماس سلولی نقش دارند. در بیماری های متعددی نظیر بیماری های اتو ایمیون بیماری های التهابی مزمن مانند COPD دچار تغییرات و کاهش عملکرد شده و استفاده از آن ها به عنوان گزینه ای برای ایمونوتراپی در شرایط مثل پیوند و در بیماری های اتو ایمیون مطرح است (۱۰). عوارض ریوی سولفورموستارد بر جانبازان شیمیایی مشابه با بیماری مزمن COPD است. در این بیماری همانند سایر بیماری ها التهابی مزمن نقایصی در سلول های Treg گزارش شده است که با عملکرد ریوی آن ها مرتبط است. از آنجاکه در جانبازان شیمیایی تغییرات ایمونولوژیک متعدد در سایتوکاین های التهابی و سلول های ایمنی ذاتی و اکتسابی نسبت به گروه کنترل، گزارش شده است (۳،۴،۶،۷).

این طور می توان نتیجه گرفت که در این افراد یک التهاب کنترل نشده وجود دارد. لذا بررسی سلول های Treg و زیر جمعیت های آن حائز اهمیت است. ما برای اولین بار در جانبازان شیمیایی از فلوسایتومتری ۵ رنگ برای ایمونوفنوتایپینگ و بررسی درصد سلول های Treg استفاده کردیم. شناسایی اختصاصی این سلول ها استفاده از مارکرهای متعددی را می طلبد.

مولکول CD25 پذیرنده IL-2 بوده که هنگام فعال شدن T سل ها روی آن ها بیان می شود سلول های Treg این مارکر را به میزان بالایی بیان کرده و به وسیله آن یکی از مکانیسم های تنظیمی خود که محروم کردن سایر T سل ها از سیگنالینگ IL-2 است می پردازند (۱۱). اما بیان این مارکر روی سایر T سل ها شناسایی Treg های 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 می شود (۱۲). استفاده از ۳ مارکر CD25 CD127 و CD4 یکی از شاخصه های Treg است که در مطالعات مختلفی از آن استفاده شده 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 سلول های Treg بوده که نقش موتاسیون در آن در بیماری IPEX کاملاً محرز است (۱۳، ۱۴). مطالعات نشان می دهد استفاده از این مارکر به همراه CD4، CD25، CD127 برای شناسایی و تعریف Treg الزامی است و حداقل مارکرهایی است که باید بدین منظور مورداستفاده قرار گیرد (۹). بررسی درصد سلول های CD4+,CD25+,CD127-،FOXP3+ در مطالعه ما تفاوت معناداری را بین گروه کنترل و مواجهه یافته نشان نداد.

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

ضمن اینکه بیماران مورد مطالعه آن ها نسبت به گروه بیماران مطالعه ما از آسیب ریوی بیشتری برخوردار بوده و میانگین FEV1/FVC آن ها از بیماران ما کمتر است. بررسی فراوانی سلول های Treg در سه گروه جانبازان شیمیایی با عوارض ریوی خفیف، متوسط و شدید می تواند روشن کننده این موضوع باشد ممکن است این سلول ها با پیشرفت به مرحله متوسط و شدید تغییرات محسوس تری را نشان دهند.

مطالعه Paats و همکاران در مبتلایان COPD و اندازه گیری سلول های Treg (CD4+,CD25+,FOXP3+) به

مطالعه حال حاضر تنها درصد سلول‌های Treg را در خون محیطی مورد بررسی قرار داده است. در صورتی که برای فهم بهتر نقش این سلول‌ها در جانبازان شیمیایی ارزیابی عملکرد آن‌ها و سلول‌های T effector کارساز خواهد بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه حال حاضر می‌توان گفت در جانبازان شیمیایی با عوارض ریوی خفیف هیچ تفاوتی از لحاظ 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 انجام شده است.

منابع

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Singer BD, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 2014;5:46.
- 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.
- 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.
- Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. *Cellular & Molecular Immunology* 2015;12(5):558.
- Sawant DV, Vignali DA. Once a Treg, always a Treg? *Immunological Reviews* 2014;259(1):173-91.
- 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.
- 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.
- Eusebio M, Kuna P, Kraszula L, Kupeczyk 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.

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

Nafiseh Zand¹, Tooba Ghazanfari^{2*}, Mahmood Bozorgmehr³, Alireza Sabetpour⁴, Soghrat Faghihzade⁵

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 author 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