

## بررسی تعداد و زیرگروه‌های سلول‌های کشنده طبیعی در افراد مبتلا به رینیت آلرژیک و مقایسه آن‌ها با افراد سالم

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۲۶

### چکیده

مهرناز مصداقی<sup>\*۱</sup>

محمد وجگانی<sup>۱</sup>، عیسی صالحی<sup>۱</sup>

جمشید حاجتی<sup>۱</sup>، عبدالفتاح صراف‌نژاد<sup>۲</sup>

مسعود موحدی<sup>۳</sup>، فریده برجیسیان<sup>۱</sup>

طاهره شهرستانی<sup>۲</sup>

۱- گروه ایمنولوژی، دانشگاه پزشکی

۲- گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت

۳- گروه کودکان

دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*

نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان پورسینا،

دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه

ایمنولوژی تلفن: ۶۶۲۱۹۵۳۶

email: mehrnaz\_mesdaghi@yahoo.com

### مقدمه

رینیت آلرژیک (Allergic Rhinitis (AR یک اختلال علامت‌دار در بینی است که پس از تماس با آلرژن القاء شده و در اثر التهاب وابسته به IgE (IgE-mediated) غشاهای پوشاننده بینی ایجاد می‌شود.<sup>۱</sup> این بیماری در سال ۱۹۲۹ توسط Hansel شرح داده شد. رینیت آلرژیک یک مشکل بهداشتی جهانی است که در کل دنیا باعث بیماری و ناتوانی زیادی می‌شود.<sup>۲</sup> در طی چهل سال آخر قرن گذشته شیوع AR افزایش پیدا کرده و در طی دهه گذشته دو برابر شده است.<sup>۳،۴</sup> به همین دلیل در طی دهه اخیر توجه زیادی به مکانیسم‌های ایجاد کننده این بیماری‌ها شده است. یکی از پیشرفت‌های مهم در این زمینه شناسایی نقش سایتوکاین‌ها در پاتوژنز این بیماری‌ها بوده است. سایتوکاین‌های نوع ۲ در بروز بیماری‌های آلرژیک نقش مهمی دارند. امروزه مشخص شده است که سایتوکاین‌های نوع ۲ فقط توسط سلول‌های CD4+ ترشح نمی‌شود. دسته‌هایی از سلول‌های CD8+ TCD8+ (Te2)، سلول‌های

زمینه و هدف: رینیت آلرژیک بیماری شایعی است که شیوع آن در سال‌های اخیر افزایش پیدا کرده و توجه زیادی به مکانیسم‌های بروز آن شده است. سایتوکاین‌های نوع ۲ نقش موثری در ایجاد پاسخ‌های آلرژیک دارند. سلول‌های کشنده طبیعی (NK) می‌توانند این سایتوکاین‌ها را تولید کنند. این مطالعه جهت بررسی دسته‌های سلول‌های NK براساس تولید سایتوکاینی و تعداد آن‌ها در مبتلایان رینیت آلرژیک در مقایسه با افراد سالم انجام شد. روش بررسی: ۲۰ بیمار رینیت آلرژیک و ۲۰ فرد سالم بررسی شدند. تعداد و سایتوکاین‌های داخل سلولی (IFN- $\gamma$  و IL-4) سلول‌های NK توسط فلوسیتومتری بررسی گردید. همچنین سلول‌های NK توسط بیدهای مغناطیسی جدا و به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. ترشح سایتوکاین‌های IL-4، IL-5، IL-10، IL-13 و IFN- $\gamma$  در محیط کشت در حالت با و بدون تحریک به وسیله ELISA اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: تعداد سلول‌های NK در گروه مورد به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه شاهد بود. درصد سلول‌های NK IL-4+ در گروه مورد بیشتر از شاهد بود ( $p < 0.001$ )، اما میزان سلول‌های IFN- $\gamma$ + تفاوتی نداشت. میزان ترشح سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های NK در گروه مورد و شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت اما میزان ترشح IL-13 پس از تحریک در گروه مورد به وضوح بیشتر از گروه شاهد بود. نتیجه‌گیری: تعداد سلول‌های NK در افراد مبتلا به رینیت آلرژیک بیشتر است و درصد قابل توجهی از آن‌ها IL-4 تولید می‌کنند.

کلمات کلیدی: آلرژی، رینیت آلرژیک، سلول کشنده طبیعی.

دندریتیک (DC2) و سلول‌های NK (NK2) نیز می‌توانند این سایتو-کاین‌ها را ترشح کنند.<sup>۵</sup> سلول‌های NK یکی از سلول‌های اصلی ایمنی ذاتی هستند که تا چند سال پیش به‌عنوان سلول‌هایی که تنها عملکرد سایتوتوکسیک دارند شناخته می‌شدند. اما اخیراً مطرح شده است که این سلول‌ها با ترشح سایتوکاین‌ها و عوامل دیگری در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، ممانعت از برخی پاسخ‌ها و تنظیم خون‌سازی دخالت دارند.<sup>۶</sup> در ابتدا تصور می‌شد که سلول‌های NK با ترشح IFN- $\gamma$ ، GM-CSF، TNF- $\alpha$ ، لنفوتاکسین، IL-8 و غیره در جهت‌دهی پاسخ‌ها به سمت واکنش حساسیتی نوع یک دخالت می‌کنند اما به تدریج مشخص گردید که احتمالاً این سلول‌ها نیز مانند سلول‌های T به چند دسته عملکردی تقسیم می‌شوند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این سلول‌ها IL-4، IL-5، IL-10، IL-13، TGF- $\beta$  و غیره ترشح می‌کنند.<sup>۷-۱۰</sup> برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ نشان داده شد که سلول‌های NK، IL-5 نیز ترشح می‌کنند.<sup>۱۱</sup> به دنبال آن Perrit نشان داد که به‌صورت In vitro

بافر رنگ آمیزی را در لوله‌های فلوسیتومتری ریخته و به هر لوله ۱۰۸ آنتی‌بادی CD16-FITC و CD56-PE (Dako, Golstrup, Denmark) اضافه شد. پس از انکوباسیون یک ساعته و دو بار شستشو نتایج توسط فلوسیتومتر بررسی گردید.

بررسی سایتوکاین‌های داخل سلولی: سلول‌های PBMC به وسیله Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) با غلظت ۵۰ ng/ml، یونومیاسین با غلظت ۵۰۰ ng/ml و Phytohaemagglutinin (PHA) با غلظت ۵ μg/ml تحریک شدند. پس از یک ساعت Brefeldin A با غلظت ۱۰ μg/ml افزوده شد (PMA، یونومیاسین، PHA و BFA: شرکت Sigma US). پس از سه ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷°C با CO2 پنج درصد، با Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit که از کمپانی BD (San Jose, CA, US) خریداری شده بود، سلول‌ها نفوذپذیر شدند. سپس ۱۰۸ از آنتی‌بادی‌های CD56-PC5، IFN-γ-FITC و IL-4-PE به همراه ایزوتایپ کنترل‌های مربوطه اضافه شد (آنتی‌بادی‌های IL-4-PE و IFN-γ-FITC: شرکت R&D, Minneapolis, US و آنتی‌بادی CD56-PC5: شرکت BD, San Jose, US). پس از انکوباسیون یک ساعته و دوبار شستشو نتایج با فلوسیتومتر بررسی شد.

جداسازی و کشت سلول‌های NK: با استفاده از Dynal NK cell negative Isolation kit (Invitrogen, US) سلول‌های NK جدا شدند. در همه موارد خلوص سلول‌ها بالای ۹۰٪ بود. سپس این سلول‌ها در پلیت (۱۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) در حالت بدون تحریک و تحریک با ۱٪ PHA به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. محیط کشت سلول‌های NK حاوی RPMI ۱۶۴۰، ۱۰٪ FCS، ۲ mM L-glutamin، ۱ mM Sodium Pyruvate و Non essential aminoacids and vitamins ۱٪، ۵۰ μmol 2-ME بود. سپس سوپ رویی سلول‌ها جدا شده و تا زمان انجام ELISA در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد.

اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها به روش ELISA: در این مطالعه سایتوکاین‌های IL-4، IL-5، IL-10، IL-13 و IFN-γ در سوپ کشت سلول‌های NK به روش ELISA و با استفاده از کیت‌هایی که از شرکت Austria Bender Medsystems، اندازه‌گیری گردیدند. حساسیت کیت‌ها برای این سایتوکاین‌ها به ترتیب ۱/۳ pg/ml، ۱/۵ pg/ml، ۱ pg/ml، ۰/۷ pg/ml و ۳۵ pg/ml می‌باشد. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۴ انجام و مقایسه داده‌ها با Student's T test و در داده‌های کیفی از تست  $\chi^2$  استفاده و مقادیر  $p < ۰/۰۵$  معنی‌دار محسوب شد.

می‌توان سلول‌های NK را به دو دسته NK1 و NK2 تمایز داد.<sup>۱۲</sup> مطالعه دیگری نشان داد که سلول‌های NK را می‌توان براساس ترشح یا عدم ترشح IFN-γ به دو دسته NK1 و NK2 تقسیم کرد. بررسی سلول‌هایی که IFN-γ ترشح نمی‌کردند نشان داد که این سلول‌ها حاوی IL-4، IL-5 و IL-13 می‌باشند.<sup>۱۳</sup> سلول‌های NK2 در پاتوزن آسم دخالت دارد. در این مطالعه پس از درمان بیماران درصد سلول‌های NK2 به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش و درصد سلول‌های NK1 افزایش یافته بود.<sup>۱۳</sup> سلول‌های NK بیماران درماتیت آتوپیک در مقایسه با افراد سالم به‌طور خود به‌خود IL-13، IL-5، IL-4 و IFN-γ بیشتری ترشح می‌کردند. این مطالعه نشان داد که سلول‌های NK1 می‌توانند با ترشح IFN-γ باعث مهار تولید Ige توسط سلول‌های B در محیط کشت شوند، اما سلول‌های NK2 چنین اثری نداشتند.<sup>۱۴</sup> این مطالعه جهت بررسی تغییرات تعداد و دسته‌های سلول‌های NK بر اساس تولید سایتوکاین‌ها در بیماران رینیت آلرژیک در مقایسه با افراد سالم انجام شد.

## روش بررسی

این مطالعه تجربی مورد-شاهدی در آزمایشگاه‌های ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، آذر ۸۵ لغایت خرداد ۸۸ انجام گردید. ۲۰ بیمار مبتلا به رینیت آلرژیک بر اساس معیارهای زیر انتخاب شدند. بیمارانی که هرگونه بیماری آلرژیک و غیر آلرژیک دیگری داشته باشند وارد مطالعه نشدند. تشخیص رینیت آلرژیک بر اساس شرح حال رینوره (Nasal discharge)، گرفتگی بینی و عطسه و خارش، (در صورتی که دو یا بیشتر از این علائم حداقل به مدت یک ساعت در بیشتر روزها وجود داشته باشد) همراه با حداقل یک معیار آتوپیک (سابقه خانوادگی آلرژی، Ige بالا یا تست پوستی مثبت) داده شد. برای رد کردن رینیت عفونی از معاینه بینی و حلق استفاده گردید. همچنین ۲۰ فرد سالم از میان دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی تهران که سابقه هیچ‌گونه بیماری آلرژیک نداشتند، وارد مطالعه شدند. قبل از نمونه‌گیری از تمامی افراد رضایت‌نامه آگاهانه اخذ می‌گردید. پس از خون‌گیری نمونه به آزمایشگاه منتقل می‌گشت. جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) با استفاده از فایکول با نام تجاری Lymphodex محصول Innotraining, Taunus, Germany و دانسیته ۱/۰۷۷ انجام می‌شد.

بررسی تعداد سلول‌های NK: تعداد ۱۰۰۰۰۰ PBMC در حجم ۲۰۰ μl

## یافته‌ها

کشت سلول‌های NK اکثر نمونه‌ها در حالت با و بدون تحریک کمتر از حد detection بود. در یک فرد مبتلا ترشح بدون تحریک IL-4 ۹/vpg/ml که قابل آنالیز آماری نبود.

ترشح با و بدون تحریک با IL-5 PHA: میزان ترشح IL-5 در سوپ کشت سلول‌های NK اکثر نمونه‌ها در حالت با و بدون تحریک کمتر از حد detection بود. تنها در یک فرد مبتلا ترشح بدون تحریک IL-5 ۸/vpg/ml که قابل آنالیز آماری نمی‌باشد.

ترشح با و بدون تحریک با IL-10 PHA: میزان ترشح IL-10 در سوپ کشت سلول‌های NK تمامی نمونه‌ها در حالت بدون تحریک کمتر از حد detection بود اما در حالت تحریک شده در گروه مورد ۲/۵±۳/۶pg/ml و در گروه شاهد ۳/۹±۱۴/۸pg/ml بود، اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

ترشح با و بدون تحریک با IL-13 PHA: میانگین و انحراف معیار میزان IL-13 در حالت با و بدون تحریک و در گروه مورد و شاهد نشان داده (جدول ۲) و میزان ترشح IL-13 در حالت تحریک شده در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد بود اما این اختلاف معنی‌دار نبود.

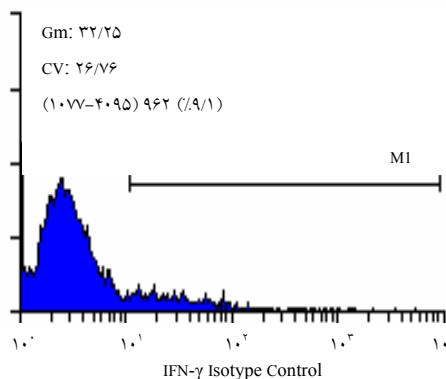
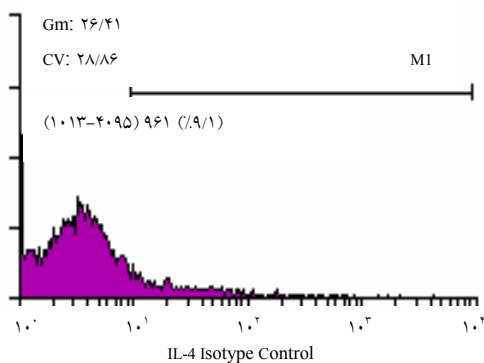
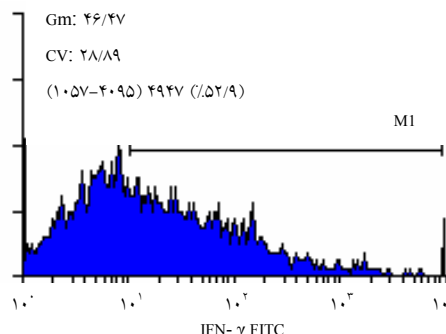
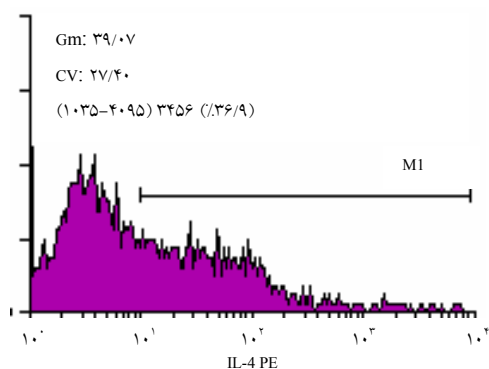
در این مطالعه ۲۰ بیمار مبتلا به رینیت آلرژیک و ۲۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند، که در هر گروه ۱۰ زن و ۱۰ مرد قرار داشتند. میانگین و انحراف معیار سن گروه مورد ۲۸/۸±۶/۹ سال و در گروه شاهد ۳۰/۶±۷/۸ سال بود که اختلاف معنی‌دار نداشت. بیماران، ۷۰٪ سابقه خانوادگی مثبت آلرژی و ۷۵٪ سابقه آلرژی‌های قبلی داشتند.

بررسی درصد سلول‌های NK در میان PBMC: در جدول ۱ درصد سلول‌های با مارکر CD16 و CD56 در گروه مورد و شاهد مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود درصد این مارکرها در گروه مورد به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه شاهد می‌باشد.

بررسی سایتوکاین‌های داخل سلولی سلول‌های NK: نتایج آنالیز سایتوکاین‌های داخل سلولی سلول‌های NK به‌طور نمونه در گراف‌های زیر نشان داده شده است.

بررسی ترشح سایتوکاینی سلول‌های NK طی کشت ۷۲ ساعته:

ترشح با و بدون تحریک با IL-4 PHA: میزان ترشح IL-4 در سوپ



شکل ۲: نمودارهای فلوسیتومتری اندازه‌گیری IL-4 داخل سلولی سلول‌های NK

شکل ۱: نمودارهای فلوسیتومتری اندازه‌گیری IFN-γ داخل سلول سلول‌های NK

جدول-۳: ترشح IFN- $\gamma$  در کشت ۷۲ ساعته سلول‌های NK (با و بدون تحریک)

p	گروه شاهد	گروه مورد	IFN- $\gamma$ level (pg/ml) Unstimulated
ns	۳۸/۱±۴۰/۷	۲۹/۶±۳۹/۶	
p	گروه شاهد	گروه مورد	IFN- $\gamma$ level (pg/ml) Stimulated
ns	۵۸/۲±۴۷/۵	۵۷/۸±۵۱/۲	

ns= non significant بر اساس Student's T test. p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

این بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک نشان داده است که این سلول‌ها نسبت به افراد سالم سایتوکاین‌های نوع دو بیشتری ترشح می‌کنند.<sup>۱۲</sup> از آنجا که تغییرات سایتوکاینی نقش موثری در بروز بیماری‌های آلرژیک دارند و مکانیسم‌های آغازگر پاسخ‌های نوع دو در بیماری‌های آلرژیک به‌خوبی شناخته نشده‌اند، بررسی تغییرات سلول‌های NK در این بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک نشان داده است که این سلول‌ها نسبت به افراد سالم سایتوکاین‌های نوع دو بیشتری ترشح می‌کنند.<sup>۱۴</sup> مطالعه دیگری نشان داده است که سلول‌های NK۲ در پاتوژنز آسم دخالت دارد.<sup>۱۳</sup> تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی سلول‌های NK در رینیت آلرژیک وجود ندارد. مطالعه حاضر جهت بررسی تغییرات تعداد و دسته‌های سلول‌های NK بر اساس تولید سایتوکاین‌ها در بیماران مبتلا به رینیت آلرژیک در مقایسه با افراد سالم انجام شد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، افراد مبتلا به AR نسبت به افراد سالم سلول‌های NK بیشتری داشتند. مطالعات قبلی نشان داده بودند که تعداد سلول‌های NK در افراد مبتلا به درماتیت آتوپیک کاهش می‌یابد.<sup>۱۳،۱۸</sup> در بیماری‌های اتوایمون نیز میزان سلول‌های NK در بیماری پمفیگوس و لگاریس افزایش، در ترومبوسیتوپنی ایدیوپاتیک و میاستنی گراو عدم تغییر و در مالتیپل اسکلروزیس، گریوز و پسوریازیس کاهش نشان داده‌اند.<sup>۲۲</sup> هدف اصلی این مطالعه بررسی دسته‌های مختلف سلول‌های NK بر اساس الگوی تولید سایتوکاینی بر اساس رنگ‌آمیزی سایتوکاین‌های داخل سلولی (IFN- $\gamma$ ، IL-4) در بیماری AR بود. این مطالعه از معدود مطالعاتی است که به بررسی تولید IL-4 توسط سلول‌های NK بدون تمایز دادن در محیط *In vitro* پرداخته و نشان داده است که تعداد قابل توجهی از سلول‌های NK در گروه مورد و شاهد IL-4 تولید می‌کردند. اغلب مطالعات قبلی پس از جداکردن سلول‌های NK به‌صورت *In vitro* و با استفاده از تحریک سایتوکاینی توانسته بودند

جدول-۱: درصد سلول‌های بیان‌کننده CD16 و CD56 در گروه مورد و شاهد

p	گروه شاهد	گروه مورد	CD16+ (%)
<۰/۰۰۸	۹/۹±۳/۸	۱۳/۳±۵/۸	
p	گروه شاهد	گروه مورد	CD56+ (%)
<۰/۰۴	۱۱/۹±۳/۱	۱۴/۹±۳/۴	

بر اساس Student's T test. p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول-۲: ترشح IL-13 در کشت ۷۲ ساعته سلول‌های NK (با و بدون تحریک)

p	گروه شاهد	گروه مورد	IL-13 level (pg/ml) Unstimulated
ns	۰/۹۷±۰/۲۹	۲±۴/۵	
p	گروه شاهد	گروه مورد	IL-13 level (pg/ml) Stimulated
ns	۱۵/۵±۲۳/۵	۲۹/۳±۴۳/۱	

ns= non significant بر اساس Student's T test. p<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ترشح با و بدون تحریک با IFN- $\gamma$  PHA: میانگین و انحراف معیار میزان IFN- $\gamma$  در حالت با و بدون تحریک و در گروه مورد و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

## بحث

رینیت آلرژیک یک مشکل بهداشتی جهانی است که در کل دنیا باعث بیماری و ناتوانی زیادی می‌شود. این بیماری افراد ساکن در تمامی کشورها و در سنین مختلف را درگیر می‌کند که بر جنبه‌های مختلف زندگی تاثیر منفی می‌گذارد.<sup>۲</sup> این بیماری بر اقتصاد فرد مبتلا، خانواده‌اش، سیستم بهداشتی درمانی و به‌طور کلی بر اقتصاد جامعه تاثیرگذار می‌باشد. جدیدترین تخمین هزینه سالانه AR در آمریکا را ۲-۵ بلیون دلار محاسبه کرده است.<sup>۱۵</sup> مکانیسم‌های ایجادکننده این بیماری‌ها شده است. یکی از پیشرفت‌های مهم در زمینه شناسایی مکانیسم‌های ایجادکننده آلرژی، شناخت نقش اساسی سایتوکاین‌ها در تنظیم پاسخ‌های Th2 بوده است.<sup>۱۳</sup> امروزه کاملاً مشخص شده است که سایتوکاین‌های نوع دو فقط توسط سلول‌های CD4+T ترشح نمی‌شود. دسته‌هایی از سلول‌های TCD8+ (Tc2)، سلول‌های دندرتیک (DC2) و سلول‌های NK (NK2) نیز می‌توانند این سایتوکاین‌ها را ترشح کنند.<sup>۱۶،۱۷</sup> مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های NK حداقل شامل دو دسته با ترشح سایتوکاینی متفاوت می‌باشند.<sup>۱۴،۱۵،۱۶</sup> از آنجا که تغییرات سایتوکاینی نقش موثری در بروز بیماری‌های آلرژیک دارند و مکانیسم‌های آغازگر پاسخ‌های نوع دو در بیماری‌های آلرژیک به خوبی شناخته نشده‌اند، بررسی تغییرات سلول‌های NK در

IL-5 بسیار اندک است، میزان این سایتوکاین‌ها در همه موارد (به غیر از یک فرد مبتلا) کمتر از حد detection کیت بود. میزان سایتوکاین IL-10 که یک سایتوکاین تنظیمی است در گروه مورد و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. میزان ترشح IFN- $\gamma$  نیز در گروه مورد و شاهد تفاوت نداشت که با نتایج مربوط به بررسی سایتوکاین‌های داخل سلولی تطابق دارد. میزان ترشح تحریک شده سایتوکاین IL-13 در گروه مورد بیشتر از گروه شاهد بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود. با افزایش حجم نمونه می‌توان بهتر به این اختلاف پی برد. در درماتیت اتوپیک ترشح IL-4، IL-5، IL-13 و IFN- $\gamma$  توسط سلول‌های NK بیشتر از افراد سالم می‌باشد.<sup>۱۴</sup> این مطالعه نشان داد که سلول‌های NK در بیماران مبتلا به AR افزایش یافته است و می‌توان سلول‌های NK را به دو دسته NK1 (حاوی IFN- $\gamma$ ) و NK2 (حاوی IL-4) تقسیم کرد.

سلول‌های NK را به سمت NK2 سوق داده و ترشح سایتوکاین‌های نوع دو را گزارش کرده‌اند.<sup>۱۴، ۱۶</sup> مطالعه Deniz نشان داده است سلول‌های NK که IFN- $\gamma$  تولید نمی‌کنند، می‌توانند IL-4، IL-5 و IL-13 تولید نمایند.<sup>۶</sup> بر اساس نتایج این مطالعه، در گروه مورد تعداد بیشتری از سلول‌های NK نسبت به گروه شاهد، IL-4+ هستند اما تعداد سلول‌های IFN- $\gamma$ + در دو گروه مشابه بود. این مطلب نشان می‌دهد که افزایش سلول‌های NK در گروه مورد بیشتر ناشی از بالا بودن میزان سلول‌های IL-4+ است. بررسی بیماران مبتلا به آسم نیز ارجحیت سلول‌های NK IL-4+ را تایید نموده است.<sup>۱۳</sup> علاوه بر بررسی سایتوکاین‌های داخل سلولی، ترشح سایتوکاینی سلول‌های NK پس از جداسازی این سلول‌ها و کشت ۷۲ ساعته نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. از آنجا که میزان ترشح سایتوکاین‌های IL-4 و

## References

- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(5 Suppl):S147-334.
- Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63 Suppl 86:8-160.
- Linneberg A, Nielsen NH, Madsen F, Frølund L, Dirksen A, Jørgensen T. Increasing prevalence of allergic rhinitis symptoms in an adult Danish population. *Allergy* 1999;54(11):1194-8.
- Lundbäck B. Epidemiology of rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28 Suppl 2:3-10.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007.
- Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blaser K, Akdis CA. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002;32(3):879-84.
- Claus M, Greil J, Watzl C. Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *J Immunol Methods* 2009;341(1-2):154-64.
- Santoni A, Zingoni A, Cerboni C, Gismondi A. Natural killer (NK) cells from killers to regulators: distinct features between peripheral blood and decidual NK cells. *Am J Reprod Immunol* 2007;58(3):280-8.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24:99-146.
- Fan YY, Yang BY, Wu CY. Phenotypically and functionally distinct subsets of natural killer cells in human PBMCs. *Cell Biol Int* 2008;32(2):188-97.
- Warren HS, Kinnear BF, Phillips JH, Lanier LL. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol* 1995;154(10):5144-52.
- Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 1998;161(11):5821-4.
- Wei H, Zhang J, Xiao W, Feng J, Sun R, Tian Z. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(4):841-7.
- Aktas E, Akdis M, Bilgic S, Disch R, Falk CS, Blaser K, et al. Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin Exp Immunol* 2005;140(2):301-9.
- Reed SD, Lee TA, McCrory DC. The economic burden of allergic rhinitis: a critical evaluation of the literature. *Pharmacoeconomics* 2004;22(6):345-61.
- Liu YJ, Kadowaki N, Risoan MC, Soumelis V. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;251:149-59.
- Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000;95(1):231-40.
- Scordamaglia F, Balsamo M, Scordamaglia A, Moretta A, Mingari MC, Canonica GW, et al. Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(2):479-85.
- Takahashi H, Amagai M, Tanikawa A, Suzuki S, Ikeda Y, Nishikawa T, et al. T helper type 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 2007;127(2):324-30.
- Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J, et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1998;86(2):123-33.
- Rojano J, Sasián S, Gavilán I, Aguilar M, Escobar L, Girón JA. Serial analysis of the effects of methimazole or radical therapy on circulating CD16/56 subpopulations in Graves' disease. *Eur J Endocrinol* 1998;139(3):314-6.
- Cameron AL, Kirby B, Griffiths CE. Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol* 2003;149(1):160-4.

## Number and subtypes of natural killer cells in patients with allergic rhinitis in comparison to healthy subjects

Received: December 28, 2009 Accepted: January 16, 2010

### Abstract

Mehrnaz Mesdaghi M.D.<sup>1\*</sup>  
Mohammad Vodjgani Ph.D.<sup>1</sup>  
Eisa Salehi Ph.D.<sup>1</sup>  
Jamshid Hadjati Ph.D.<sup>1</sup>  
Abdolfattah Sarrafnejad Ph.D.<sup>2</sup>  
Masoud Movahedi M.D.<sup>3</sup>  
Farideh Berjisian B.S.<sup>1</sup>  
Tahereh Shahrestani B.S.<sup>2</sup>

1- Department of Immunology,  
School of Medicine

2- Department of Immunology,  
School of Public Health

3- Department of Pediatrics, School  
of Medicine

Tehran University of Medical  
Sciences

**Background:** Allergic rhinitis is a common disorder with great morbidity. Its prevalence has increased during recent years, therefore attracting attentions to its mechanisms. Type 2 cytokines play a major role in allergies. It has been proposed that Natural killer (NK) cells may be able to produce type 2 cytokines. This study was done to evaluate NK cells number and subtypes in patients with allergic rhinitis, comparing healthy subjects.

**Methods:** In a case control study, patients with allergic rhinitis were compared to healthy non-atopic subjects. Allergic rhinitis was diagnosed according to ARIA guidelines. NK cells quantity was studied by staining of peripheral blood mono nuclear cells with anti-CD16-FITC and anti-CD56-PE and evaluated by two color flowcytometry. Intracellular cytokines were evaluated by tri-color flowcytometry. NK cells were separated by magnetic beads, and cultured for 72 hours. Secretion of IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, and IFN- $\gamma$  was measured by ELISA, in stimulated and unstimulated conditions.

**Results:** Patients had more CD16+ CD56+ NK cells than control group. IL-4+ NK cells were significantly higher in patients ( $p < 0.001$ ), but the number of IFN- $\gamma$ + NK cells was not different. Cytokine secretion of NK cells was similar in case and control groups. Although IL-13 level after stimulation seemed higher in patients, the difference was not significant.

**Conclusion:** NK cells number is increased in patients with allergic rhinitis and a considerable number of them produce IL-4.

**Keywords:** Allergy, allergic rhinitis, cytokine.

\* Corresponding author: Dept. of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran  
Tel: +98-21-66419536  
email: mehrnaz\_mesdaghi@yahoo.com