

مقایسه فراوانی سلولهای NKT خون محیطی بیماران مسلول مقاوم به درمان و افراد سالم با آزمون پوستی توپر کولین مثبت و منفی

دکتر علی شمس^{۱*}، دکتر احمد زواران حسینی^۲، دکتر محمدرضا مسجدی^۳، دکتر شاپور شاه قاسم پور^۴، دکتر مجید ریانی^۵، دکتر نسرین اسفندیاری^۶، دکتر مجید پورامیری^۷

چکیده

مقدمه: سلولهای 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. اهمیت این سلولها در عفونتهای درون سلولی مانند مایکوباکتریوم توپر کلوزیس به خوبی روشن نشده است. هدف این مطالعه بررسی تعداد این سلولها در خون محیطی بیماران مسلول مقاوم به درمان و مقایسه آن با افراد مصون نسبت به سل است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع مورد-شاهدی است و چهار گروه از افراد سالم و بیمار شامل ۲۵ بیمار مسلول مقاوم به درمان، ۳۰ بیمار مسلول تازه تشخیص داده شده که درمان نگرفته بودند و ۳۰ فرد سالم با تست توپر کولین جلدی مثبت (PPD+) و ۳۰ فرد سالم با تست توپر کولین جلدی منفی (PPD-) انتخاب شدند. تعداد دو جمعیت از سلولهای NKT با مارکرهای $V\alpha 24V\beta 11$ و $CD3CD56$ در خون محیطی این افراد با استفاده از فلوسایتومتری تعیین و در گروههای مورد مطالعه مقایسه شد.

نتایج: یافته‌های این مطالعه نشان داد که تعداد سلولهای $V\alpha 24+V\beta 11+$ در خون محیطی بیماران مسلول تازه تشخیص داده شده و بیماران مسلول مقاوم به درمان به طور معنی داری کمتر از افراد سالم PPD+ بود در حالیکه تعداد سلولهای $CD3+CD56+$ در گروه‌های مورد بررسی تفاوت معنی داری نشان نداد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه کاهش تعداد سلولهای NKT با مارکرهای $V\alpha 24$ و $V\beta 11$ ممکن است در عفونت‌زایی مایکوباکتریوم توپر کلوزیس بویژه در بیماران مسلول مقاوم به درمان نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سلولهای NKT، مایکوباکتریوم توپر کلوزیس، سل مقاوم به درمان، آزمون توپر کولین

مقدمه

هستند که خصوصیتی از سلولهای T و NK را نشان می‌دهند. اکثر سلولهای NKT در انسان یک گیرنده با تنوع محدود از سلولهای T با زنجیره‌های $V\alpha 24J\alpha 18$ و $V\beta 11$ بر سطح خود بروز می‌دهند. نوع دیگری از این سلولها در خون محیطی انسان وجود دارند که این گیرنده را ندارند و در عوض شاخصهای $CD3$ و $CD56$ را بروز میدهند. ارتباط عملکردی بین این دو نوع سلول هنوز مشخص نشده است. سلولهای NKT ممکن است فاقد مولکولهای $CD4$ و $CD8$ باشند که به آنها سلولهای NKT دوگانه منفی می‌گویند. جمعیتی از سلولها NKT نیز مولکولهای $CD4$ یا

سلولهای NKT (Natural Killer T cells) جمعیتی از سلولهای T

* نویسنده مسئول: استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
تلفن: ۰۳۵۱ ۸۲۴۱۷۵۱، نامبر: ۰۳۵۱ ۸۲۴۹۷۰۵
Email: alishams@ssu.ac.ir

۲- استاد گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
۳- استاد گروه بیماریهای عفونی، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی مسیح دانشوری
۴، ۵- استادیار بخش مایکوباکتریولوژی، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی مسیح دانشوری
۶- ۷- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی تهران
تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۰/۲۶

استاندارد انجام شد. در این آزمون ۰/۱ میلی لیتر از آنتی ژن PPD (Purified Protein Derivative, Razi, Iran) بصورت داخل درمی تزریق شد. پس از ۴۸ ساعت قطر ناحیه متورم در محل تزریق اندازه گیری شد. قطر بیش از ۱۰ میلی متر به عنوان افراد PPD+ در نظر گرفته شدند (۸). در شرح حالی که از این افراد به عمل آمد، همگی آنها سابقه دریافت واکسن BCG را داشتند و از نظر بالینی همگی این افراد سالم بودند.

گروه دوم: افراد سالم با تست پوستی توبرکولین منفی یا (-PPD): این افراد هیچگونه سابقه‌ای از برخورد یا تماس با افراد مسلول نداشتند، تست پوستی توبرکولین مانند افراد گروه اول انجام شد. در صورتی که قطر تورم در محل تزریق کمتر یا مساوی ۱۰ میلیمتر بود از آنها برای مرحله بعد دعوت به عمل می‌آمد. دو هفته بعد مجدداً تست پوستی توبرکولینی با همان مقدار PPD انجام شد و پس از ۴۸ ساعت نتیجه بررسی می‌گردید. در صورتی که قطر تورم کمتر یا مساوی ۱۰ میلی متر بود آن شخص به عنوان PPD منفی در نظر گرفته می‌شد. ۱۲ نفر از این افراد سابقه واکسیناسیون با BCG داشتند و مابقی واکسن نزده بودند. این افراد بعد از دو هفته برای نمونه‌گیری به مرکز تحقیقات سل دعوت شدند.

گروه سوم: بیماران با سل فعال (Tuberculosis) که تازه تشخیص داده شده بودند یا New case: این بیماران با انجام آزمونهای خلط و اسمیر و سایر علائم کلینیکی توسط متخصص عفونی مسلول تشخیص داده شدند. این افراد قبل از اینکه درمان را شروع نمایند یا حداکثر در هفته اول درمان دارویی وارد مطالعه ما شدند.

گروه چهارم: بیماران مسلول مقاوم به درمان (MDR-TB) Multidrug-Resistant Tuberculosis: طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی (۹) کسانی که نتیجه کشت خلط آنها حداقل به ریفامپین و ایزونیاژید مقاوم باشد به عنوان بیماران مسلول مقاوم به درمان در نظر گرفته شدند. به علاوه، این بیماران همچنین حداقل یک دوره درمان سل اولیه را تحت نظارت مستقیم پزشک طی کرده بودند.

CD8 را بروز می‌دهند. سلولهای NKT همچنین شاخصهایی از سلولهای NK مانند CD161 یا NK1.1 و CD56 بیان می‌کنند (۱،۲).

برای تکامل سلولها NKT مولکولهای CD1d، سایتوکینهای IL-7، IL-15 و لنفوتوکسین مورد نیاز هستند. در انسان تعداد این سلولها در افراد مختلف متفاوت و کمتر از موش است. در کبد انسان تعداد این سلولها حدود ۱٪ و در خون محیطی کمتر از ۰٫۱٪ لنفوسیتها را تشکیل می‌دهد (۳).

لیپید آلفا گالاکتوز سرامید (α -Galactosyl ceramid or α -GalCer) لیگاند اختصاصی گیرنده $V\alpha 24V\beta 11$ سلولهای NKT است. این سلولهای در تحریک با این لیپید مقادیر فراوانی از سایتوکین‌های تنظیم کننده ایمنی مانند IL-4 و IFN- γ تولید می‌کنند (۴،۵). از آنجاییکه بیش از ۶۰٪ وزن خشک دیواره سلولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را لیپیدها تشکیل می‌دهند، سلولهای NKT و سلولهای T محدود به CD1 نقش مهمی در پاسخهای ایمنی علیه مایکوباکتریوم بازی می‌کنند. نقش سلولهای NKT انسانی محدود به CD1d در پاسخ ایمنی علیه مایکوباکتریوم هنوز مورد بحث است (۵). موشهای فاقد سلولهای NKT پاسخهای گرانومایی را بروز نمی‌دهند. این سلولها در موش با تولید بیشتر IFN- γ نسبت به انسان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پاسخ می‌دهند (۶). تعداد این سلولها در خون محیطی بیماران مبتلا به ایدز نسبت به افراد سالم کاهش نشان می‌دهد (۷) اما فراوانی این سلولها در بیماران مسلول و به ویژه مسلول مقاوم به درمان هنوز تعیین نشده است. با توجه به اینکه بیماری سل یکی از شایع ترین بیماریهای عفونی در دنیا است و شیوع سوبه‌های مقاوم به درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از نگرانیهای بسیاری از کشورها از جمله ایران است، لزوم این مطالعه احساس می‌گردد.

روش بررسی

جامعه مورد مطالعه:

جامعه مورد مطالعه شامل چهار گروه بود:

گروه اول: افراد سالم با تست پوستی توبرکولین مثبت یا (PPD+): در این گروه از افراد آزمون پوستی توبرکولین بصورت

بررسی سایر نمونه‌های این فرد بر اساس این کنترل انجام گرفت. در هر آنالیز بیست هزار سلول توسط دستگاه شمارش و درصد و تعداد مطلق سلولهای NKT در یک میلیون لنفوسیت تعیین گردید.

آنالیزهای آماری: در هر گروه میانگین درصد فراوانی سلولهایی که با آنتی بادیهای مورد نظر رنگ گرفته بودند تعیین شد. با آزمون کروسکال والیس معنی دار بودن اختلاف بین گروه‌ها مشخص گردید و سپس مقایسه‌های دو به دو بین گروه‌ها با استفاده از آزمون Mann-Whitney U test انجام شد. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار بودن سطح اختلاف در نظر گرفته شد.

نتایج

یک نمونه از نمودارهای نقطه‌ای فلوسایتومتری در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل 1-A یک نمونه کنترل از رنگ آمیزی سلولهای لنفوسیتی برای هر فرد را نشان می‌دهد. شکل 1-B یک نمونه از نمودار نقطه‌ای سلولهای NKT رنگ آمیزی شده با آنتی‌بادهای فلورسنت علیه $V\alpha 24$ و $V\beta 11$ را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که آنتی‌بادی علیه $V\alpha 24$ با ماده FITC و آنتی‌بادی علیه $V\beta 11$ با PE کوئژوگه است. در شکل 1-C یک نمونه از رنگ آمیزی دو رنگی برای شاخص‌های CD3CD56 را نشان می‌دهد.

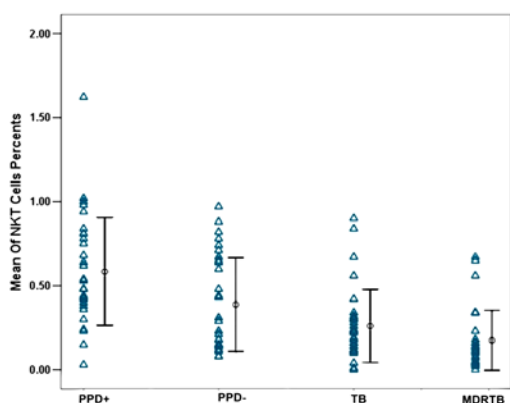
در بررسی فراوانی سلولهای NKT $V\beta 11V\alpha 24$ در گروه‌های مورد مطالعه این نتایج حاصل شد. بر اساس آزمونهای آماری در بیماران MDR-TB و TB در مقایسه با افراد سالم PPD مثبت تعداد این سلولها کاهش معنی داری نشان می‌دهد اما تعداد این سلولها بین گروه‌های افراد سالم PPD مثبت و PPD منفی تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل ۲). همچنین بر اساس این اطلاعات تعداد سلولهای NKT $V\beta 11V\alpha 24$ در افراد PPD منفی با بیماران مسلول تازه تشخیص داده شده تفاوت معنی داری نداشت (P=۰/۱۴) فراوانی سلولهای NKT افراد سالم PPD منفی بطور معنی داری از بیماران MDR-TB بیشتر بود (P=۰/۰۰۱). از طرفی تعداد سلولهای NKT $V\beta 11V\alpha 24$ بین بیماران مسلول تازه تشخیص داده شده با بیماران MDR-TB تفاوت معنی داری نشان نداد.

در بررسی فراوانی تعداد سلولهای NKT CD3CD56 در این

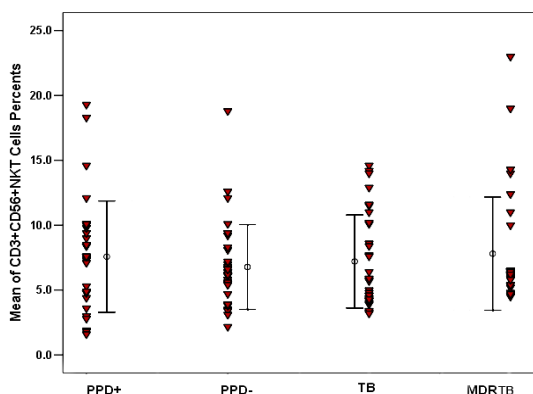
از گروه‌های افراد سالم PPD مثبت و PPD منفی و نیز افراد مسلول ۳۰ نفر انتخاب و وارد مطالعه شدند. اما از بین بیماران MDR-TB تنها ۲۵ نفر شرایط ورود به مطالعه را پیدا کردند. این مطالعه با مجوز کمیته اخلاق پزشکی مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران انجام شد. تمامی بیماران از بیمارستان مسیح دانشوری دارآباد تهران انتخاب شدند. پس از کسب رضایت کامل بیماران و افراد سالم از هر فرد ۱۵ میلی لیتر خون وریدی هپارینه گرفته شد.

بررسی های فلوسایتومتری: بررسیهای فلوسایتومتری توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD) FACSCalibuer انجام گرفت. برای بررسی های فلوسیتومتری در ابتدا ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی مورد نظر در لوله مخصوص فلوسایتومتری ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر خون تام تازه با ضد انعقاد هپارین اضافه شد. نمونه‌ها ۱ دقیقه تکان داده شدند به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از انکوباسیون مقدار ۱ میلی لیتر محلول لیزینگ اضافه شد. مقدار لیزینگ افزوده شد به حجم ۳ میلی لیتر رسانده، ۱۲ دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون نمونه‌ها ۵ دقیقه در دور ۳۰۰ سانتریفوژ شدند. مایع رویی به طور کامل تخلیه و سلولها در ۳ میلی لیتر PBS سوسپانسیون شدند. پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در ۳۰۰ مایع رویی به طور کامل تخلیه شد. سلولها در ۱۰۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون شدند و ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی دوم اضافه، ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. نمونه‌ها پس از انکوباسیون سانتریفوژ شدند. ۱ میلی لیتر محلول فیکس اضافه شد و تکان داده شدند. این نمونه‌ها حداکثر ۲۴ ساعت بعد توسط فلوسایتومتری بررسی شدند. بررسی‌ها فلوسایتومتری به صورت دو رنگی انجام شد. در این مطالعه این آنتی بادیها مورد استفاده قرار گرفتند: Anti-CD56، Anti-CD3، Anti-CD8، Anti-CD4، Anti-CD45 و Anti-CD45 همه از شرکت ساخت کشور دانمارک Anti-CD161، Anti-V β 11، Anti-V α 24. از شرکت Immunotec-Beckman ساخت آمریکا. از آنتی‌بادی کنترل با ایزوتایپ یکسان با آنتی‌بادها علیه شاخص‌های مورد نظر استفاده گردید. آنالیز نمونه‌ها بر اساس آنتی بادیها کنترل انجام شد.

مطالعه مشخص شد که بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. (شکل ۳)



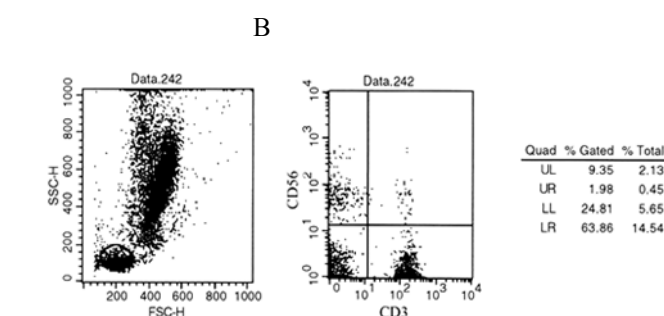
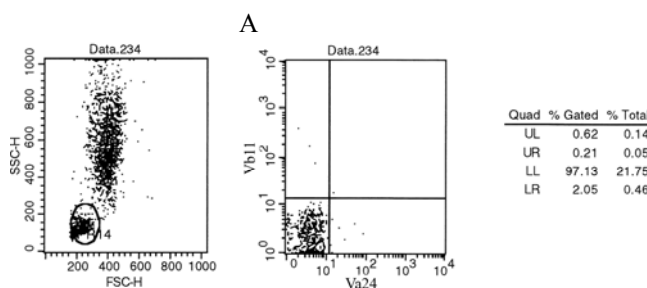
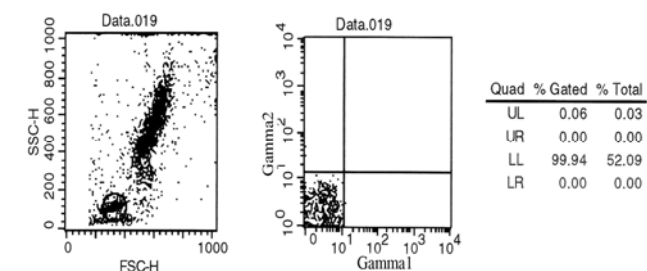
شکل ۲: مقایسه میانگین درصد فراوانی سلولهای NKT با مارکرهای $V\alpha 24V\beta 11$ در خون محیطی بیماران و افراد سالم. بر اساس آزمونهای آماری در بیماران MDR-TB و TB در مقایسه با افراد سالم PPD+ تعداد این سلولها کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد.



شکل ۳: مقایسه میانگین درصد فراوانی سلولهای NKT با مارکرهای $CD3+CD56+$ در خون محیطی افراد مورد مطالعه. بر اساس بررسی‌های آماری تفاوت معنی‌داری در فراوانی این سلولها در بیماران و افراد سالم مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در اواخر دهه ۱۹۹۰ میلادی اثبات شد که سلولهای T سیستم ایمنی انسان می‌توانند به آنتی ژنهای لیپیدی رد یک روش وایسته به مولکولهای CD1 پاسخ دهند. در همین راستا در تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ به وسیله نویسندگان این مقاله منتشر شد نیز به این نتیجه رسیدیم که سلولهای T و NKT می‌توانند به آنتی ژنهای لیپیدی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پاسخ دهند و این پاسخها در بیماران مسلول دچار اشکالاتی نسبت به افراد سالم ایمن هستند (۱۰). امروزه جنبه‌های فراوانی از عملکردهای سلولها



شکل ۱: نمودارهای آنالیز فلوسایتمتری: شکل A سلولهای کنترل منفی را نشان میدهد که آنالیزها بر اساس این سلولها انجام گرفت. شکل B سلولهای NKT که با آنتی بادیهای anti-V β 11-PE و anti-V α 24-FITC رنگ شده اند. شکل C فلوسایتمتری سلولهای NKT که با آنتی بادیهای anti-CD3-FITC و anti-CD56-PE رنگ شده اند.

جدول ۱: نتایج مربوط به مقایسه درصد فراوانی سلولهای NKT با مارکرهای $V\alpha 24V\beta 11$ و $CD3CD56$ به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	تعداد	سلولهای $V\alpha 24V\beta 11$	سلولهای $CD3CD56$
PPD+	۳۰	0.588 ± 0.301	7.781 ± 4.36
PPD-	۳۰	0.482 ± 0.322	6.90 ± 3.32
TB	۳۰	0.342 ± 0.260	7.33 ± 3.65
MDR-TB	۲۵	0.248 ± 0.124	7.94 ± 4.43

NKT تعیین شده است و روز به روز بر اهمیت این سلولها افزوده می شود به نحوی که مطالعات سال ۲۰۰۸ میلادی نشان می دهد که همکاری سلولهای NKT و سلولهای CD8T در ریشه کنی عفونت ویروس هپاتیت B بسیار مؤثر است که این کشفیات دیدگاههای جدیدی از روشهای درمانی در بیماریهای عفونی را پیش رو می گذارد (۱۱). متأسفانه تعداد مطالعات در مورد نقش سلولهای NKT در عفونت های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بسیار محدود است و هنوز شناخت دقیقی از نقش این سلولها در بیماری سل در دست نیست. در کشور ما بعلت مجاورت با کشورهایمانند افغانستان و کشورهای آسیای میانه تعداد بیماران مسلول و مسلول مقاوم در حال افزایش است و شناخت نقش سلولهای NKT در بیماری سل می تواند به درمان موثرتر و ارزاتر این بیماری کمک نماید.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد سلولهای NKT+CD3+CD56 در خون محیطی بیماران TB و MDR-TB تعداد سلولهای با افراد سالم PPD+ و PPD- تفاوت معنی داری ندارد. این سلولها در عفونتهای HBV و سیروز کبدی نقش ایفا میکنند (۱۱،۱۲) و سبب تخریب سلولهای تولیدکننده انسولین و دیابت در انسان می شوند (۱۳). بر اساس مطالعه ما فراوانی این سلولها در بیماری سل تغییر محسوس ندارد.

در این مطالعه همچنین مشخص شد که جمعیت اصلی سلولهای NKT (یعنی سلولهایی که گیرنده $V\alpha 24V\beta 11$ را بروز میدهند) در بیماران MDR-TB و TB نسبت به افراد سالم PPD+ کاهش دارد. این جمعیت از سلولهای NKT در بسیاری از بیماریها و سرطانها مورد توجه هستند. این سلولها بیشتر نقش تنظیم کنندگی پاسخهای ایمنی دارند. بر اساس بعضی از مطالعات این سلولها از بیماریها خودایمن جلوگیری می کنند (۱۴،۱۳). در بیماریهای عفونی نقش این سلولها هنوز مشخص نشده است. در عفونت HIV-1 تعداد این سلولها کاهش معنی داری دارد اما این سلولها در تعیین میزان پیشرفت بیماری دخالت ندارند (۷).

سلولهای NKT موشی در طیفی از بیماریهای عفونی از جمله مالاریا، حصبه، سل، توکسوپلاسمایس، لیستریوز و هپاتیت نقش دارند (۱۷-۱۴). واکنش گرانولوماتوز در موش به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وابسته به سلولهای NKT است (۶) و عفونت مایکوباکتریال سبب تحریک تولید IFN- γ از این سلولها می شود (۱۵). سلولهای NKT در موشهای فاقد مولکولهای MHC-II سبب ایمنی حیوان در عفونت توکسوپلاسمایس می شوند (۱۶). فعالیت این سلولها سبب حفاظت علیه مالاریا و HBV در موشها می شود (۱۷،۱۶). با توجه به اهمیت سلولهای NKT $V\alpha 24V\beta 11$ ، کاهش این سلولها در بیماری سل بنظر می رسد که با پیشرفت بیماری سل ارتباط داشته باشد به ویژه در مطالعاتی که همین تیم تحقیقاتی انجام گرفته و نتایج آن هنوز منتشر نشده است در ظرفیت تولید IFN- γ سلولهای NKT در بیماران MDR-TB نسبت به افراد سالم PPD مثبت نقص وجود دارد. مطالعات بیشتر در خصوص عملکرد این سلولها در مواجهه با باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ترکیباتی از باکتری که می توانند سبب فعالیت این سلولها شوند ضروری به نظر می رسد.

نتیجه گیری

از آنجاییکه سلولهای NKT به عنوان سلولهای محوری در تنظیم پاسخهای ایمنی به حساب می آیند و در جهت گیری پاسخهای ایمنی سلولی علیه عوامل عفونی درون سلولی نقش مهمی دارند قسمتی از ضعف و عدم پاسخ ایمنی موثر در بیماران مسلول مقاوم به درمان میتواند به علت کاهش تعداد و تغییر در عملکرد این سلولها در این بیماران باشد.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی مرکز تحقیقات سل و بیماریهای مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی تهران انجام شد.

References

- 1- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. *NKT cells: what's in a name*. Nat Rev Immunol 2004; 4: 231-7.
- 2- Zhou D, Mattner J, Cantu III, Schrantz N, Yin N, Gao Y, et al. *Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells*. Science 2004; 306: 1786-9.
- 3- Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu III C, Zhou D, et al. *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*. Nature 2005; 434: 525-9.
- 4- Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, et al. *Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells*. Nature 2005; 434: 520-5.
- 5- Lee JS, Song CH, Kim CH, Kong S-J, Sohn SM, Kim HJ, et al. *Profiles of IFN- γ and its regulatory cytokines (IL-12, IL-18 and IL-10) in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis* Clin Exp Immunol 2002; 128 : 516-24.
- 6- Apostolou I, Takahama Y, Belmant C, Kawano T, Huerrer M, Marchal G, et al. *Murine natural killer T (NKT) cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls*. Proc. Natl. Acad. Sci 1999; 96, 5141-46.
- 7- Vliet HJV, von Blomberg BME, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, et al. *Selective Decrease in Circulating V24 α V β 11 NKT Cells During HIV Type 1 Infection*. J Immunol 2002; 168: 1490-5.
- 8- Ulrichs T, Moody DB, Grant E, Kaufmann SHE, Porcelli SA. *T cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with Mycobacterium tuberculosis infection*. Infect Immun 2003; 71: 3076-87.
- 9- *World Health Organization 2006 Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*. WHO/HTM/TB/2006.361
- 10- Shahemabadi AS, Zavarani AH, Shaghasempour SS, Masjedi MR, Rayani M, Pouramiri M. *Evaluation of T cell immune responses in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patients to mycobacterium tuberculosis total lipid antigens*. Clin Exp Immunol, 2007, 179: 285-94.
- 11- Ito H, Ando K, Ishikawa T, Nakayama T, Taniguchi M, Saito K, et al. *Role of Va141 NKT cells in the development of Hepatitis B virus-specific CTL: activation of Va14 NKT cells promotes the breakage of CTL tolerance*. International Immunology 2008; 20(7), 869-79.
- 12- Hunger RE, Mueller C, Z'graggen K, Friess H, Büchler MW. *Cytotoxic cells are activated in cellular infiltrates of alcoholic chronic pancreatitis*. Gastroenterology 112:1656, 1997.
- 13- Ou D, Metzger DL, Wang X, Pozzilli P, Tingle AG. *β -cell antigen-specific CD56+ NKT cells from type 1 diabetic patients: autoaggressive effector T cells damage human CD56+ β cells by HLA-restricted and non-HLA-restricted pathways*. Human Immunol 2002; 63(4), 256-70.
- 14- Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AJ. *NKT cells: facts, functions and fallacies*. Immunology Today 2000; 21(11); 573-83.
- 15- Emoto M, Emoto Y, Buchwalow IB, Kaufmann SHE. *Induction of IFN- γ -producing CD4+natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin*. Eur J Immunol 1999, 29:650.
- 16- Pied SJ, Roland, Louise A, Voegtle D,

Soulard V, Mazier D, Cazenave PA. *Liver CD4-CD8-NK1.1+ TCR $\alpha\beta$ intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro.* J. Immunol 2000, 164: 1463.

17- Gonzalez-Aseguinolaza G, De Oliveira C,

Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, et al. *A-Galactosylceramide-activated Va14 Natural Killer T cells mediate protection against murine malaria.* Proc. Natl. Acad. Sci 2000: 97; 8461-68.