

## غلظت پلاسمایی CD26 و CD30 در بیماری سالک

دکتر رضا جعفری شکیب\* - دکتر سهیلا اژدری\*\* - دکتر خامسی پور\*\*\* - دکتر محمدعلی شکرگزار\*\*\*\* - دکتر حسین مرتضوی\*\*\*\*\* -  
دکتر بهاره ملک افضلی\*\*\*\*\* - دکتر بهروز نیک بین\*\*\*\*\*

\* استادیار گروه میکروپ شناسی و ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

\*\* استادیار گروه ایمنی شناسی، انستیتو پاستور تهران

\*\*\* دانشیار مرکز بیماریهای پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\*\* استادیار مرکز بانک سلولی انستیتو پاستور تهران

\*\*\*\*\* استادیار گروه پوست، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\*\*\* استادیار مرکز بیماریهای پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\*\*\* استاد گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲۴

تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۲۶

### چکیده

مقدمه: شایع ترین شکل لیشمانیا نوع پوستی آن یعنی سالک است که ضایعه ای جلدی بوده و معمولاً با به جای گذاشتن جوشگاه ناخوش آیندی خودبخود بهبود می یابد اگر چه بندرت ممکن است بیماری به شکل غیر بهبود یابنده ظهور کند که به درمان های رایج نیز مقاوم خواهد بود پاسخ Th1 در شکل بهبود یابنده و پاسخ Th2 در شکل غیر بهبود یابنده بیماری نشان داده شده است. از طرف دیگر نشانگرهای CD26 و CD30 مولکولهای سطحی هستند که به ترتیب عمدتاً بر سطح سلول های Th1 و Th2 بیان می شوند و در بعضی بیماری ها به ترتیب ارتباطی بین میزان پلاسمایی CD26 (sCD26) و CD30 (sCD30) و پاسخ های Th1 و Th2 یافت شده است.

هدف: بررسی ارتباط بین افزایش غلظت پلاسمایی sCD26 و sCD30 و پاسخ Th1/Th2 در بیماری سالک برای یافتن مارکرهای ایمونولوژی در پیش بینی روند بیماری.

مواد و روش ها: در این مطالعه که در سال ۱۳۸۲ بر بیماران مراجعه کننده به بیمارستان رازی یا مرکز آموزش و پژوهش بیماری های پوست و جذام تهران انجام شده، غلظت پلاسمایی sCD26 و sCD30 در ۳۶ بیمار با ضایعه بهبود یابنده، ۱۰ بیمار با ضایعه غیر بهبود یابنده و ۲۳ شاهد بدون سابقه سالک به روش ELISA اندازه گیری شده است

نتایج: sCD26 و sCD30 در بیماران غیر بهبود یابنده به طور معنی داری بالاتر از بیماران با ضایعه بهبود یابنده و گروه شاهد بود ( $p < 0.05$ ) اگر چه این اختلاف در sCD30 بارزتر از sCD26 بود، ولی بین دو گروه بیماران و شاهد با زخم بهبود یابنده اختلافی معنی دار در غلظت پلاسمایی sCD26 و sCD30 دیده نشد. نتیجه گیری: در مجموع به نظر می رسد که میزان sCD30 می تواند به عنوان شاخصی برای بررسی نوع پاسخ ایمنی در بیماری سالک در نظر گرفته شود.

**کلید واژه ها:** آنتی ژن های سی دی ۲۶ / آنتی ژن های سی دی ۳۰ / لیشمانیاز جلدی

### مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری انگلی است و عامل آن گونه های مختلف انگل تک یاخته جنس لیشمانیا (leishmania) هستند. تظاهر بالینی این بیماری بسته به گونه انگل لیشمانیا و پاسخ ایمنی میزبان، از ضایعه پوستی خود بخود بهبود یابنده تا بیماری احشایی کشنده متفاوت است (۱) لیشمانیوز جلدی بیماری اندمیک در مناطق حاره و تحت حاره جهان از جمله

ایران است که در کشور ما بیشتر به سالک معروف است. عامل این بیماری در ایران معمولاً L. tropica و L. major و ندرتاً L. infantum است (۲). تظاهرات بالینی سالک اکثراً به صورت ضایعه جلدی خودبخود بهبود یابنده (healing) است که حتی بدون درمان معمولاً با برجای گذاشتن جوشگاه بهبود می یابد و معمولاً فرد در برابر ابتلای به

است (۱۶،۱۵). شکل محلول CD30 (sCD30) بعد از فعالیت سلولی در سرم آزاد می‌شود. غلظت sCD30 در بعضی از بیماری‌های اتوپیک مانند درماتیت اتوپیک (۱۷) و آسم (۱۸) افزایش می‌یابد. در این مطالعه سطح سرمی sCD26 و sCD30 در بیماران مبتلا به سالک در دو شکل بهبود یابنده و غیر بهبود یابنده اندازه‌گیری شد تا ارتباط احتمالی بین این نشانگرها و نوع پاسخ Th1/Th2 و تظاهرات بالینی آنها روشن شود. در این صورت شاید بتوان از اندازه‌گیری این نشانگرها به عنوان روشی ساده برای بررسی نوع پاسخ Th1/Th2 استفاده کرد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۳۶ بیمار مبتلا به سالک شکل بهبود یابنده و ۱۰ بیمار مبتلا به سالک شکل غیر بهبود یابنده که در سال ۱۳۸۲ به مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام و یا بیمارستان رازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران مراجعه کرده بودند انتخاب شدند. بیماران غیر بهبود یابنده زخم را حداقل به مدت دو سال داشتند و دست کم سابقه یک دوره درمان کامل با گلوکانتیم و ندادن پاسخ به درمان را داشتند. بیماری سالک در این افراد از نظر مشاهده انگل با روش گسترش مستقیم و یا کشت ثابت شده بود. ۲۳ داوطلب نیز از مناطق غیراندیمیک، بدون سابقه سالک و با آزمون پوستی لیشمانین منفی (leishmanin skin test) به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند (جدول ۱). ابتدا اهداف طرح برای شرکت‌کنندگان به زبان ساده شرح داده شد و در صورت تمایل داوطلبان به شرکت در طرح و پس از امضای رضایت‌نامه، مورد معاینه بالینی قرار گرفتند تا بیماری دیگری بجز سالک نداشته باشند. از این افراد خون هپارینه گرفته شد و پلاسما جدا شده آن در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  تا موقع استفاده نگهداری شد.

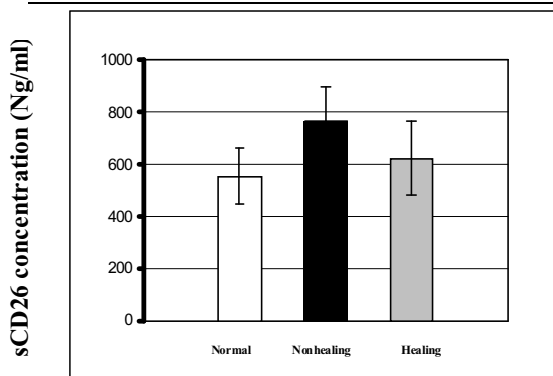
عفونت بعدی مصون می‌شود. بندرت ممکن است سالک به شکل غیر بهبود یابنده (non-healing) درآید و سال‌ها ضایعه باقی بماند و به انواع درمان‌ها مقاوم است (۳).

در نژادهای خالص موش آلوده به L. major پاسخ ایمنی و تعادل بین Th1 (تولید IFN- $\gamma$ ) و Th2 (تولید IL-4 و IL-5) کاملاً "با تظاهرات بالینی مطابقت دارد" (۴). سلول‌های Th2 در نژادهای حساس افزایش می‌یابند که همراه با پیشرفت بیماری و انتشار آن به احشاء و در نهایت مرگ است؛ ولی در نژادهای مقاوم پاسخ Th1 بروز می‌کند که باعث بهبود و مقاومت در برابر عفونت مجدد می‌شود (۵).

هر چند در لیشمانیوز انسانی ارتباط تظاهرات بالینی با پاسخ Th1/Th2 به طور مشخص نشان داده نشده است ولی در سالک بهبود و مصونیت معمولاً با مثبت شدن واکنش از دیاد حساسیت تاخیری (آزمون پوستی لیشمانین LST) و بروز پاسخ Th1 در کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) در پاسخ به تحریک آنتی‌ژن‌های لیشمانیا همراه است (۸-۶) که در افراد مبتلا به سالک غیربهبود یابنده پاسخ ایمنی از نوع Th2 است (۱۰-۸). نوع پاسخ Th1/Th2 معمولاً با بررسی سایتوکاین‌های خاص تولیدشده توسط سلول‌ها در محیط کشت مشخص می‌شود اما اخیراً گزارش‌هایی مبنی بر بیان انتخابی نشانگرهای مختلف روی هر یک از این زیر گروه‌ها ارائه شده است (۱۴-۱۲).

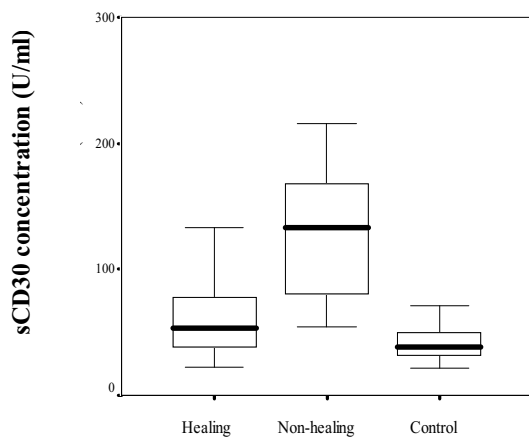
یکی از این نشانگرهای سطحی CD26 است که فعالیت آنزیمی دارد و اولین بار به عنوان مارکر فعالیت سلول‌های T معرفی شد (۱۱). طبق گزارش‌های اخیر بیان CD26 توسط سلول‌های T به پاسخ Th1 مربوط است (۱۲ و ۱۳) و شکل محلول پلاسمایی آن (sCD26) اثر تنظیمی بر پاسخ سلول‌های T دارد ولی اهمیت فیزیولوژیک این یافته هنوز روشن نیست (۱۴).

CD30 مارکر دیگر است که فعالیت سلول‌های T را نشان می‌دهد و بیشتر با الگوی ترشح سایتوکاینی Th2 مربوط



شکل ۱: مقایسه sCD26 در سه گروه

سطح پلاسمایی sCD30: نتایج نشان می‌داد که غلظت sCD30 در گروه بیماران غیربهبودیابنده (۲۱۶-۵۴/۴) و ۱۳۳ در گروه بهبودیابنده (۱۴۵/۶-۵۳/۶) و در گروه شاهد (۷۱/۲-۲۲/۴) واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بود که از نظر آماری بین گروه غیر بهبود یابنده با گروه بهبودیابنده و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود داشت ( $p < 0/05$ ) ولی بین گروه بهبودیابنده و شاهد اختلاف معنی‌دار نبود (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه sCD30 در سه گروه

### بحث و نتیجه‌گیری

اولین بار Mossman و همکاران در موش نشان دادند که زیر گروه‌های Th1 و Th2 سایتوکاین‌های متفاوتی ترشح می‌کنند که به ترتیب مسئول مقاومت و حساسیت در مقابل

جدول ۱: مشخصات گروهها

شاهد	بهبود یابنده	غیربهبود یابنده	
۲۳	۳۶	۱۰	تعداد
۳۳/۵±۶/۱	۳۰/۴±۱۶/۳	۲۷/۲±۲۰/۸	سن (سال)
-	۵/۶±۵/۷	۹۲/۴±۴۸/۳	میانگین مدت بیماری (ماه)
۴ به ۱۹	۸ به ۲۷	۲ به ۸	نسبت مرد به زن
۰	۲۰	۷	تست لیشمانین مثبت (بالای ۵ میلی متر)

میزان غلظت sCD26 و sCD30 با کیت‌های module set شرکت Bender Medsystems, Vienna, Austria به روش Sandwich ELISA طبق دستور سازنده اندازه‌گیری شد. حساسیت آزمایش برای sCD26، ۷۸ نانوگرم در میلی‌لیتر و برای sCD30، ۶/۴ واحد در میلی‌لیتر بود.

داده‌ها با نرم‌افزار Sigmatat 2 و با توجه به توزیع نرمال یا غیرنرمال آن آنالیز گردید. نتایج sCD26 به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده و با روش ANOVA تجزیه و تحلیل شده است. نتایج sCD30 به صورت میانه (بیشترین-کمترین مقدار) نشان داده شده و با روش Kruskal-Wallis تجزیه و تحلیل شده است و سطح اطمینان  $p < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

سطح پلاسمایی sCD26: نتایج نشان داد که غلظت sCD26 در گروه بیماران غیربهبودیابنده (۱۳۴/۴۲-۷۶۴/۸) و در گروه بهبودیابنده (۱۴۱/۰۵±۶۲۳/۵) و در گروه شاهد (۱۰۸/۲±۵۵۴/۵) نانوگرم در میلی‌لیتر بود که از نظر آماری بین گروه بیماران غیربهبودیابنده با گروه بهبود یابنده و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود داشت ( $p < 0/05$ ) ولی بین گروه بهبودیابنده و گروه شاهد این اختلاف معنی‌دار نبود (شکل ۱).

بارز بالاتر از دو گروه دیگر بود که مشابه با دیگر نتایج نشانه نقش احتمالی پاسخ Th2 در مزمن شدن بیماری می‌تواند باشد (۹و۸). افزایش اندک sCD30 در افراد گروه بهبود یافته در مقایسه با شاهد می‌تواند به دلیل فعال شدن لنفوسیت‌ها و تکثیر آنها باشد زیرا CD30 تا حدودی نشان‌دهنده فعالیت سلول‌های T نیز هست (۱۵). افزایش معنی‌دار sCD26 در گروه غیر بهبود یافته می‌تواند ناشی از فعالیت Th1 (البته همراه با Th2) باشد چنین وضعیتی (پاسخ توام Th1 و Th2) در لیشمانیوز پوستی مخاطی از آمریکای جنوبی نیز گزارش شده است (۱۹). البته افزایش نیافتن قابل توجه CD26 در گروه بیماران بهبود یافته این احتمال را ضعیف می‌کند. از طرف دیگر گزارش‌هایی مبنی بر افزایش این مارکر بر سطح کراتینوسیت‌ها در ضایعات التهابی پوست نیز وجود دارد (۲۴). بنابراین، این احتمال وجود دارد که در شکل غیربهبود یافته به دلیل التهاب مزمن مقدار sCD26 افزایش یافته باشد. از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که شاید اندازه‌گیری sCD30 روش مفیدی برای ارزیابی پاسخ ایمنی در بیماران مبتلا به سالک باشد. اما در این باره لازم است تا بررسی‌های بیشتری مخصوصاً با روش فلوسیتومتری انجام شود.

عفونت با L. major هستند (۴). مطالعاتی در مورد پاسخ‌های ایمنی در لیشمانیوز انسانی انجام شده است. نتایج در انسان مانند مدل موشی مشخص نیست، ولی اکثراً در جریان بیماری و بهبود، آزمون پوستی لیشمانین مثبت می‌شود و کشت سلولی در پاسخ به آنتی‌ژن‌های لیشمانیا الگوی پاسخ Th1 را نشان می‌دهد (۶، ۹ و ۱۹). اخیراً بعضی نشانگرهای سطح سلولی شناسایی شده‌اند که ترجیحاً با فعالیت سلول‌های Th1 و Th2 همراه هستند بررسی این نشانگرها امکانی را فراهم می‌کند که بدون بررسی سایتوکاین‌ها که عملی پرهزینه، وقت‌گیر و نیازمند تجربه زیاد است بتوان الگوی پاسخ Th1/Th2 را با روش ساده‌تری از راه تعیین این نشانگرها مشخص کرد هیچ‌کدام از این مارکرها انحصاری نیستند، لیکن بررسی هم‌زمان چند نشانگر مثل sCD26 و sCD30 امکان نتیجه‌گیری دقیق‌تر را برای تعیین پاسخ Th1/Th2 در لیشمانیوز انسانی میسر می‌سازد. sCD26 و sCD30 در بعضی موارد مثل حاملگی و همودیلایز بررسی شده‌اند و اندازه‌گیری آنها در ارزیابی پاسخ Th1/Th2 مفید بوده (۲۰ و ۲۱)، اما در بعضی از بیماری‌ها کم‌کننده نبوده است (۲۲ و ۲۳). در این مطالعه غلظت sCD30 در گروه غیربهبود یافته به‌طور

## منابع

1. Reed SG, Scott PA. Immunologic Mechanisms in Leishmania. In: Cunningham MW, Fujinami RS. (Editors). Effects of Microbes on Immune System. 1<sup>st</sup> Edition. Philadelphia; Lippincott Williams, 2000: 537-554.
- 2- صائی، اسماعیل: بیماری‌های انگلی در ایران. تهران، انتشارات حیان، ۱۳۷۷.
3. Dowlati Y. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Aspect. Clin Dermatol 1996; 14(5): 425-431.
4. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two Types of Murine Helper T Cell Clones. J Immunol 1986; 136: 2348-57.
5. Reiner SL, Locksley RM. The Regulation of Immunity to Leishmania Major. Ann Rev Immunol 1995; 13:151-77.
6. Kemp M, Hey AS, Kurtzhals JA, et al. Dichotomy of the Human T cell Response to Leishmania Antigens, Th1 Like Response to Leishmania Major promastigote Antigens in Individuals Recovered from Cutaneous Leishmaniasis. Clin Exp Immunol 1994; 96:410-415.
7. Mahmoodi M, Khamesipour A, Dowlati Y, et al. Immune Response Measured in Human Volunteers Vaccinated with Autoclaved Leishmania Major Vaccine Mixed with Low Dose of BCG. Clin Exp Immunol 2003; 134. 303-308.

8. Ajdari S, Alimohammadian MH, Eslami MB, et al. Comparison of Immune Profile of Non-healing Cutaneous Leishmaniasis Patients with Those with Active Lesions and Those who Have Recovered From Infection. *Infect Immunity* 2000; 98: 1760-4.
9. Habibi GR, Khamesipour A, McMaster WR, Mahboudi F. Cytokine Gene Expression in Healing and Non- Healing Cases of Cutaneous Leishmaniasis in Response to in Vitro Stimulation with Recombinant gp63 Using Semi-Quantitative RT-PCR. *Scand J Immunol* 2001; 54:414-420.
- ۱۰- مرتضوی، حسین؛ خامسی پور، علی؛ حلاجی، زهرا؛ [و دیگران]: مقایسه تولید اینترفرون گاما و آزمون پوستی لیشمانین در موارد لیشمانیوز پوستی بهبود نیابنده با موارد بهبود یافته از بیماری. فصلنامه بیماریهای پوست، ۱۳۸۱، شماره ۲۰، صص: ۹-۳.
11. Fox DA, Hussey RE, Fitzgerald KA, et al. Ta<sub>1</sub>, A Novel 105 KD Human T cell Activation Antigen Defined by a Monoclonal Antibody. *J Immunol* 1984; 133: 1250-1256.
12. Scheel-Toellner D, Richter E, Toellner KM, et al. CD26 Expression in Leprosy and Other Granulomatous Diseases Correlate with the Production of IFN- $\gamma$ . *Lab Invest* 1995; 73:685-690.
13. Willheim M, Ebner C, Baier K, et al. Cell Surface Characterization of T Lymphocytes and Allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 Expression with Th1 Subsets. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:348-55.
14. Von Bonin A, Huhn J, Fleischer B. Dipeptidyl Peptidase IV/CD26 on T Cells Analysis of an Alternative T Cell Activation Pathway. *Immunological Review* 1998; 161:43-53.
15. Falini B, Pileri S, Pizzolo G, et al. CD30 (Ki-1) Molecule: A New Cytokine Receptor of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily as a Tool for Diagnosis and Immunotherapy. *Blood* 1995; 85: 1-14.
16. Del Prete, De Carli M, Almerigogna F, et al. Preferential expression of CD30 by human CD4+ T Cells producing Th2 type Cytokines. *FASEB Journal* 1995; 9: 81-6.
17. Katoh N, Hirano S, Suehiro M, et al. Soluble CD30 is More Relevant to Disease Activity of Atopic Dermatitis than Soluble CD26. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:187-92.
18. Leonard C, Tormey V, Faul J, et al. Allergen-Induced CD30 Expression on T Cells of Atopic Asthmatics. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:780-786.
19. Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, et al. Intermediate or Chronic Cutaneous Leishmaniasis: Leukocyte Immunophenotypes and Cytokine Characterisation of the Lesion. *Exp Dermatol* 2002; 11(1): 34-41.
20. Hoshimoto K, Ohta N, Ohkura T, Inaba N. Changes in Plasma Soluble CD26 and CD30 During Pregnancy: Markers of Th1/Th2 Balance?. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(4): 260-3.
21. Nakao K, Nagake Y, Okamoto A, et al. Serum Levels of Soluble CD26 and CD30 in Patients on Hemodialysis. *Nephron* 2002; 91(2): 215-221.
22. Bengtsson A. The Role of CD30 in Atopic Disease. *Allergy* 2001; 56:593-603.
23. Keane NM, Price P, Lee S, et al. An Evaluation Serum Soluble CD30 Levels and Serum CD26 (DDP IV) Enzyme Activity as Markers of Type 1 and Type 2 Cytokines in HIV Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Exp Immunol* 2001; 126(1): 111- 116.
24. Novell M, Savoia P, Fierro M T, et al. Keratinocytes Express Dipeptidyl-Peptidase IV (CD26) in Benign and Malignant Skin Diseases. *Br J Dermatol* 1996; 134: 1052-1056.

## Soluble CD26 and CD30 Concentration in Cutaneous Leishmaniasis

Jafari Shakib R. (Ph.D), Ajdari S. (Ph.D), Khamesipour A. (Ph.D), Shokrgozar M.A. (Ph.D), Mortazavi H. (MD), Malakafzali B(MD), Nikbin B. (Ph.D)

### Abstract

**Introduction:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of leishmaniasis that usually heals spontaneously with unsightly scar but rarely non-healing lesion of CL develops which is refractory to all types of therapy. It is shown that Th1 and Th2 response is associated with healing and non-healing form of the diseases, respectively. On the other hand, it is reported that CD26 and CD30 are associated with Th1 and Th2 types of response, respectively. In some diseases, there is a relationship found between level of CD26 and CD30 and Th1 and Th2 responses.

**Objective:** The goal of this study was to determine the concentration of soluble CD26 and soluble CD30 (sCD26 and sCD30) as a possible marker for Th1/Th2 response in CL

**Materials and Methods:** The blood samples were taken from 36 patients with healing form of the lesion and 10 patients with non-healing form of CL who were referred to Razi hospital or Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy in Tehran during 2003-2004. As a control blood samples were taken from 23 volunteers with no history of CL. In this study, the concentration of sCD26 and sCD30 were measured in plasma by ELISA method.

**Results:** The results showed that the plasma levels of sCD26 and sCD30 were significantly higher in non-healing form of the disease than healing form of CL or control group ( $p < 0.05$ ). The level of sCD30 was more prominent than sCD26. There was no significant difference in the level of sCD26 or sCD30 markers in healing form of CL compared to normal control group.

**Conclusion:** Overall it seems that the level of sCD30 might be a useful marker to study the immune response in CL, which needs to be studied further.

**Key words:** Antigens, CD 30/ Antigens, CD 26/ Leishmaniasis, Cutaneous