

## نقش اینترلوکین-۱۸ و پذیرنده اینترلوکین-۲ در بیماری حاد پیوند علیه میزبان پس از پیوند مغز استخوان

دکتر مسعود ایروانی (استادیار)\*، دکتر مزگان شایگان (استادیار)\*\*، دکتر غلامرضا بابائی (دانشیار)\*\*\*، دکتر علی طالبیان (متخصص)\*\*\*\*،  
دکتر اردشیر قوام زاده (استاد)\*، دکتر بابک بهار (استادیار)\*، دکتر مهناز آقائی پور (استادیار)\*\*\*\*\*  
\* متخصص هماتولوژی، انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی و پیوند مغز استخوان - بیمارستان دکترشریعی  
\*\* سازمان انتقال خون ایران - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، بخش ایمونولوژی  
\*\*\* PhD آمار حیاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، بخش آمار حیاتی  
\*\*\*\* متخصص کلینیکال و آناتومیکیال پاتولوژی، معاونت فنی و کنترل کیفی سازمان انتقال خون ایران  
\*\*\*\*\* متخصص کلینیکال و آناتومیکیال پاتولوژی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، بخش آزمایشگاه ایمونولوژی

### چکیده

مقدمه: بیماری حاد پیوند علیه میزبان (acute Graft-Versus-Host Disease) (aGVHD) یکی از عوارض اصلی پس از پیوند مغز استخوان (Bone Marrow Transplantations) (BMT) است که پیش بینی وقوع آن مشکل می‌باشد. تصور میشود سایتوکائینهای آزاد شده از لنفوسیت‌های TH1 نقش اساسی در آن ایفا میکنند. توانائی پیش بینی وقوع این عارضه بسیار ارزشمند است. با اندازه‌گیری دوره‌ای مقادیر سرمی گیرنده اینترلوکین-۲ (IL-2R) و اینترلوکین-۱۸ (IL-18) پس از پیوند آلورژن مغز استخوان تلاش نمودیم رابطه آنها را با aGVHD و بعنوان شاخص مفیدی برای پیشگویی آن تعیین نمائیم.

مواد و روشها: غلظت سرمی IL-2R و IL-18 با استفاده از روش ELISA در ۲۱۹ نمونه بدست آمده از ۳۹ بیمار (مبتلا به بدخیمی‌های خونی، قبل و بعد از BMT) و ۲۸ فرد سالم بعنوان کنترل تعیین شدند. همه بیماران پیوند را از خواهر یا برادر خود دریافت نموده بودند.

یافته‌ها: نتایج ما نشان دادند که ۲۵ بیمار به aGVHD مبتلا شده و غلظت سرمی IL-2R و IL-18 در نمونه‌های قبل از پیوند در آنها در مقایسه با بیماران فاقد این عارضه aGVHD و گروه کنترل افزایش یافته و بین غلظت سرمی IL-2R و IL-18 در نمونه‌های قبل از پیوند در بیماران aGVHD- و گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود. غلظت سرمی IL-18 در گروه aGVHD+ طی روزهای ۳-۲۴ پس از پیوند بصورت معناداری نسبت به قبل از پیوند افزایش یافت و بر اساس شدت aGVHD (GVHD 0 - GVHD III) نیز متفاوت بود. در اکثر بیماران aGVHD+ (۶۰٪) غلظت‌های سرمی IL-2R و IL-18 در روز دهم پس از پیوند به حداکثر مقدار خود رسید و افزایش غلظت آن دو بر ظهور علائم aGVHD (با میانگین ۱۵ روز پس از پیوند) پیشی گرفته است. غلظت سرمی IL-18 در روز دهم رابطه معناداری بر حسب شدت aGVHD دارد (با افزایش شدت عارضه غلظت آن نیز افزایش می‌یابد). غلظت سرمی IL-18 در بیمارانی که تحت درمان با فلودارابین و بوسولفان بودند نسبت به بیماران تحت درمان با سیکلوفسفامید و بوسولفان کمتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: این نتایج نشان دادند که IL-18 نقش مهمی در گسترش aGVHD پس از پیوند مغز استخوان ایفا میکند و مقدار آن ممکن است یکی از شاخص‌ها برای aGVHD و منعکس کننده شدت آن باشد همچنین این یافته‌ها مطرح میکنند IL-18 در بیماری زائی این عارضه موثر بوده و اندازه‌گیری مقادیر سرمی آن میتواند معیار مناسبی در پیش بینی aGVHD باشد.

I (2R) طی فعالیت ایمنی چون GVHD افزایش می‌یابد (۹) و غلظت آن با شدت aGVHD مرتبط شناخته شده است (۱۱،۱۲). از آنجا که aGVHD بیماری با واسطه لنفوسیت‌های T میباشد و IL-18 نیز احتمالاً در پاسخ‌های Th1 ضروری می‌نماید (۱) و با توجه به گزارشات متعدد در مورد افزایش غلظت سرمی IL-2R، IL-18 طی aGVHD پس از BMT (۱، ۹، ۱۱) و ارتباط با شدت عوارض حاصله و مطرح شدن ارزش پیشگویی کنندگی آنها، به بررسی این عوامل در بیماران تحت BMT و ارتباط با شدت aGVHD و افزایش غلظت آنها تا فاصله بروز علائم بیماری پرداختیم.

## مواد و روش‌ها

از دی ماه ۱۳۸۱ تا تیر ماه ۱۳۸۲، تعداد ۴۱ بیمار که تحت پیوند مغز استخوان آلورژنیک قرار گرفتند، وارد مطالعه شدند. این مطالعه از نوع توصیفی و نمونه‌گیری آن تصادفی است. خون محیطی فاقد ماده ضد انعقاد برای هر بیمار حتی الامکان در ۶ نوبت (قبل از پیوند و هفتگی در روزهای ۳، ۱۰، ۱۷، ۲۴ و ۳۰ پس از پیوند) با سرنگ استریل گرفته و پس از انتقال سریع نمونه‌ها و جداسازی سرم تا زمان انجام آزمایش‌ها در  $4^{\circ}\text{C}$  -۷۰ ذخیره شدند. ۲ بیمار بعلت عدم انتقال همه نمونه‌های مربوطه به آزمایشگاه از مطالعه حذف شدند و غلظت سرمی IL-2R، IL-18 بر روی ۲۱۹ نمونه ارسالی از ۳۹ بیمار در محدوده سنی ۴۸-۳ سال، شامل ۱۸ (۴۶٪) فرد مونث و ۲۱ (۵۳٪) فرد مذکر و ۲۸ فرد سالم بعنوان گروه کنترل در محدوده سنی ۳-۵۲ سال شامل ۱۴ (۵۰٪) فرد مونث و ۱۴ (۵۰٪) فرد مذکر تعیین گردیدند. برای تعیین غلظت سرمی IL-2R از کیت h - Interleukin - 2 - Receptor ELISA (Roche) و IL-18 (از کیت human IL-18 ELISA محصول Bender MedSystem - اتریش) استفاده شده است. جهت بررسی آماری اطلاعات جمع‌آوری شده، غلظت سایتوکاین‌ها در هر گروه در روزهای مختلف از آزمون Paired T-Test

## مقدمه

بیماری حاد پیوند علیه میزبان (aGVHD) acute Graft-Versus-Host Disease پس از پیوند مغز استخوان (BMT)، Bone Marrow Transplantations عارضه بالقوه کشنده‌ای است که روده، کبد و پوست را درگیر نموده و توسط لنفوسیت‌های T بافت پیوندی پس از آنکه توسط IL-12 مترشح از سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن به سمت سلول‌های T (نوع ۱) گرایش یافتند ایجاد می‌گردد. سلول‌های T (نوع ۱) شامل: سلول‌های Th1 (CD4+) و سلول‌های Tc1 (CD8+) هستند که تولید اینترفرون گاما ( $\gamma$ -IFN) و اینترلوکین ۴ (IL-4) می‌نمایند (۱). IL-18 و IL-12 نیز از سایتوکاین‌های Th1 می‌باشند (۲). سلول‌های T (نوع ۲) شامل: سلول‌های Th2 (CD4+) و سلول‌های Tc2 (CD8+) می‌شوند که تولید اینترلوکین‌های ۴، ۵ و ۱۰ (IL-4 / 5 / 10) می‌نمایند. علاوه بر ترشح سایتوکاین‌ها سلول‌های Tc1 از مسیرهای وابسته به پرفورین و Fas و سلول‌های Tc2 از مسیرهای وابسته به پرفورین منجر به لیز سلولی می‌شوند (۳). IL-18 سایتوکاینی است که توسط ماکروفاژها تولید شده و تولید  $\gamma$ -IFN توسط لنفوسیت‌های T و B و سلول‌های کشنده طبیعی (NKC) را القا می‌کند (۱).

IL-18 اثرات قوی تعدیل ایمنی (immunomodulatory) داشته (۴) و بسته به زمینه ایمونولوژیک توانایی بی‌ظنیری در القا گرایش به سمت Th1 را دارد (۴،۵،۶). مطالعات متعددی بیانگر افزایش غلظت IL-18 در aGVHD پس از BMT می‌باشند (۷،۸،۹،۱۰). طی فعال شدن بروز پذیرنده IL-2R IL-2 در سطح لنفوسیت‌های T فعال شده افزایش می‌یابد این پذیرنده شامل سه زیر گروه آلفا، بتا و گاما می‌باشد (۹) که پس از اتصال IL-2 به IL-2R زیرگروه آلفا (CD25) از مجموعه فوق در خون رها می‌شود و تحت عنوان پذیرنده محلول IL-2 (s IL-2)

Grading (شدت GVHD) تفاوت معناداری دارد ( $P < 0/05$ ) و در گروه بیماران GVHD-III a بیشتر است (در گروه بیماران مبتلا به GVHD-IV a بعلت حضور فقط یک مورد فراوانی قادر به آنالیز آماری نشدیم) و میانگین غلظت سرمی آن در روز ۱۰ + با شدت GVHD a ( $P = 0/047$   $t = 0/41$ ) همبستگی معنی داری را نشان می دهد.

جدول ۱ - اطلاعات مربوط به کل بیماران

ویژگی	کل افراد	افراد مونث	افراد مذکر
تعداد	۳۹ (۱۰۰٪)	۱۸	۲۱
محدوده سنی (سال)	۳ - ۴۸	۴ - ۴۲	۳ - ۴۸
مبتلا به ALL	۷	۳	۴
مبتلا به AML	۱۰	۵	۵
مبتلا به CML	۸	۴	۴
مبتلا به تالاسمی مازور	۱۱	۵	۶
مبتلا به آنمی آپلاستیک	۱	-	۱
مبتلا به استئوپتروزیس و MDS	۲	-	۲
عدم وقوع GVHD a پس از پیوند	۱۴	۶	۸
وقوع GVHD a Grade-0	۲	-	۲
وقوع GVHD-I a	۴	۱	۳
وقوع GVHD-II a	۱۰	۵	۵
وقوع GVHD-III a	۸	۶	۲
وقوع GVHD-IV a	۱	-	۱
وقوع Skin-GVHD	۵	۲	۳
وقوع GI-GVHD	۴	۳	۱
وقوع Skin + GI GVHD	۱	-	۱
LIVER			
وقوع GI + Skin GVHD	۱۵	۶	۹
وقوع CMVD	۱۱	۴	۷
تحت درمان با فلودارابین + بوسولفان	۱۱	۵	۶
تحت درمان با بوسولفان + سیکلوفسفامید	۲۷	۱۳	۱۴
تحت درمان با اندوکسان + ALG	۱	-	۱

در بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس متعدد و برای بررسی ارتباطات از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شده است.

## یافته‌ها

اطلاعات مربوط به سن، جنس، بیماری‌های زمینه‌ای، وقوع aGVHD و رژیم دارویی در جدول شماره ۱ خلاصه شده اند. نتایج این مطالعه نشان دادند که:

- بین سن و جنس افراد گروه کنترل و بیماران اختلافی مشاهده نمی‌شود (با  $P = 0/05$ )

- میانگین غلظت IL-18 و IL-2R بر حسب سن و جنس (در هر دو گروه) و بیماری زمینه‌ای در گروه بیماران اختلاف معنی داری نشان نمی‌دهد (با  $P = 0/05$ ) و با این عوامل رابطه‌ای ندارد.

- میانگین غلظت سرمی IL-18 در گروه کنترل ( $34/41 \pm 47/9$  pg/ml) با کل بیماران، قبل از پیوند، ( $82/2 \pm 129/2$  pg/ml) تفاوت معناداری دارد ( $P = 0/001$ )

- میانگین غلظت سرمی IL-2R در گروه کنترل ( $64/85 \pm 25/2$  U/ml) با کل بیماران، قبل از پیوند، ( $94/9 \pm 55/9$  U/ml) تفاوت معناداری دارد ( $P = 0/002$ )

- میانگین غلظت سرمی IL-18 در گروه کنترل با گروه بیماران aGVHD<sup>-</sup>، قبل از پیوند ( $37/94$  pg/ml) تفاوت معناداری ندارد اما با گروه بیماران aGVHD<sup>+</sup> ( $112/73$  pg/ml) دارای اختلاف معنی دار می‌باشند. ( $P = 0/05$ )

- میانگین غلظت سرمی IL-2R، در گروه کنترل با گروه بیماران aGVHD<sup>-</sup> قبل از پیوند ( $77$  U/ml) تفاوت معناداری ندارد اما با گروه بیماران aGVHD<sup>+</sup> ( $105/34$  U/ml) دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ( $P = 0/05$ )

- میانگین غلظت سرمی IL-18 در روزهای مختلف پس از پیوند در گروه بیماران aGVHD<sup>-</sup> با گروه بیماران aGVHD<sup>+</sup> (جدول ۲ و شکل ۱) دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ( $P < 0/05$ ) و در بیماران aGVHD<sup>+</sup> بیشتر می‌باشد.

- میانگین غلظت سرمی IL-18 در روزهای ۳ تا ۲۴ پس از پیوند در گروه بیماران aGVHD<sup>+</sup> بر حسب GVHD

- بین سن ( $r = -0/25$  و  $P = 0/14$ ) و جنس اهدا کنندگان و گیرندگان پیوند در این مطالعه با شدت aGVHD رابطه‌ای مشاهده نشد.

- غلظت IL-18 در ۲ تن از بیماران گروه aGVHD که بعداً به cGVHD نیز مبتلا شدند، نسبت به سایر افراد این گروه غلظت بیشتری را نشان داد (در محدوده  $402/5$  Pg/ml -  $102$ ).

- میانگینهای غلظت IL-18 قبل از پیوند در افراد تحت درمان با فلوئورابین - بوسولفان ( $69/2$  Pg/ml) و افراد تحت درمان با بوسولفان - سیکلوفسفامید ( $94/43$  Pg/ml) با  $P = 0/013$  با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

در برخی مطالعات انجام شده بعلت محدوده وسیع تغییرات غلظت IL-2R از مقایسه Peak غلظتی قبل و بعد از پیوند استفاده شده است، علیرغم اینکه در این مطالعه تغییرات وسیع غلظت IL-2R مشاهده نشد، از این اندکس استفاده گردید اما تغییرات و ارتباطات بدست آمده معنادار نبودند.

جدول ۲- غلظت سرمی IL-18 (pg/ml) و IL-2R (U/ml)

در گروه کنترل و بیماران (قبل از پیوند)

گروه	بیماران	گروه کنترل
aGVHD <sup>-</sup>	aGVHD <sup>+</sup>	گروه کنترل
n= 14	n= 25	n= 28
میانگین غلظت سرمی IL-18	37/92	112/63
حداکثر- حداقل	0-402/5	0-171/9
میانگین غلظت سرمی IL-2R	77	64/85
حداکثر- حداقل	30-554/5	41-445/6
		32/2

- از افراد تحت درمان با فلوئورابین + بوسولفان ۷ مورد aGVHD<sup>-</sup> ( $63/13$ ٪) و ۴ مورد aGVHD<sup>+</sup> ( $37/37$ ٪) اما از افراد تحت درمان با بوسولفان + اندوکسان (سیکلوفسفامید) ۷ مورد aGVHD<sup>-</sup> ( $25/9$ ٪) و ۲۰ مورد aGVHD<sup>+</sup> ( $74/1$ ٪) می‌باشند.

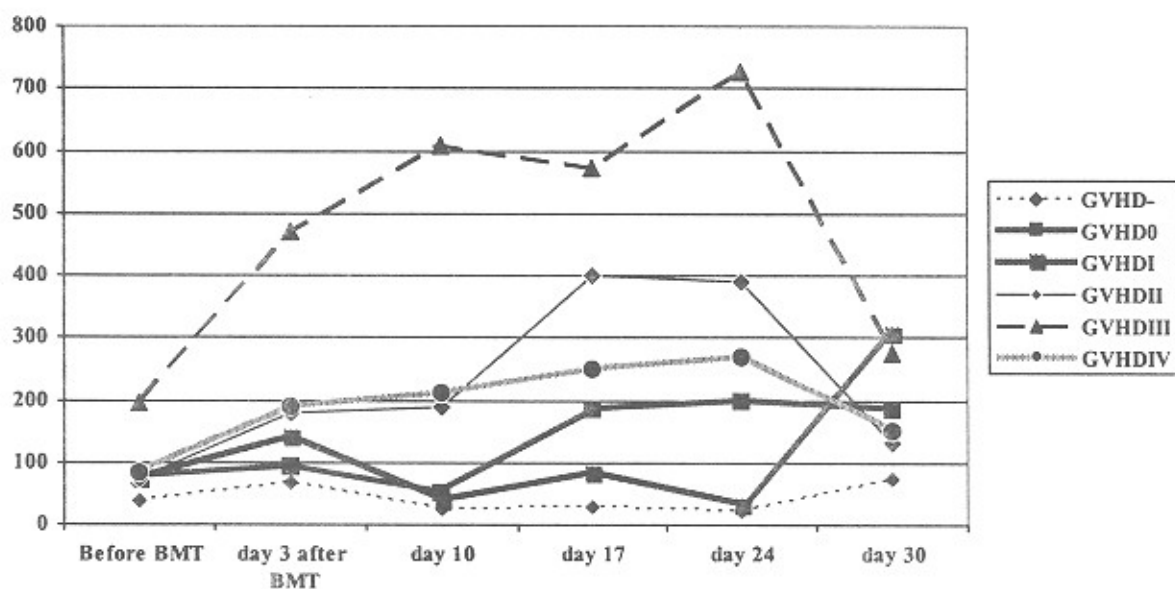
- فقط ۲ تن از بیماران گروه - aGVHD، بعداً به cGVHD مبتلا شدند.

- غلظت سرمی IL-2R در روزهای مختلف پس از پیوند (شکل ۲) در بیماران با GVHD Grading (شدت aGVHD) رابطه معناداری ندارد ( $P = 0/117$ )، ولی با روز شروع علائم aGVHD ارتباط معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $r = 0/72$ ،  $P = 0/002$ ).

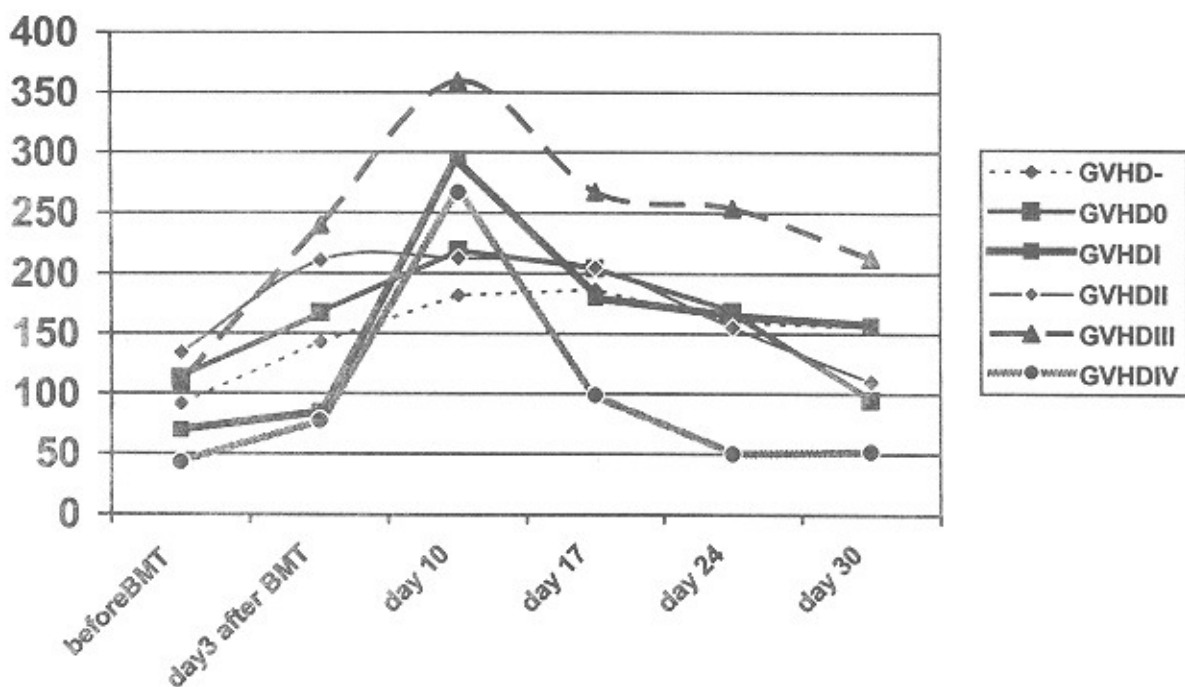
- غلظت سرمی IL-2R در ۱۷ نفر از ۲۵ فرد مبتلا به aGVHD ( $68$ ٪) و غلظت IL-18 در ۱۳ نفر ( $52$ ٪) قبل از بروز علائم aGVHD در آنها افزایش نشان می‌دهند و مدتی پس از بروز علائم aGVHD و با پیشرفت درمان غلظت IL-2R در ۱۳ نفر ( $52$ ٪) و غلظت IL-18 در ۱۱ نفر ( $44$ ٪) مجدداً کاهش یافته‌اند.

- میانگین بروز علائم GVHD، ۱۵ روز پس از پیوند می‌باشد. غلظت سرمی IL-2R در ۹ نفر از گروه aGVHD- ( $64/3$ ٪) و در ۱۵ نفر از گروه aGVHD+ ( $60$ ٪) در روز دهم به حداکثر (Peak) میزان خود می‌رسد. اما تعیین روز خاص برای به حداکثر (Peak) رسیدن غلظت IL-18 آسان نمی‌باشد. طی روز سوم پس از پیوند در ۹ نفر ( $36$ ٪)، طی روز دهم در ۶ نفر ( $24$ ٪)، طی روز هفدهم در ۸ نفر ( $45/44$ ٪)، طی روز بیست و چهارم در ۴ نفر ( $16$ ٪) و طی روز سی‌ام در ۳ نفر ( $12$ ٪) از ۲۵ فرد گروه aGVHD+ به حداکثر می‌رسد. به عبارتی می‌توان مطرح کرد مقادیر IL-18 و IL-2R در ۶۰٪ موارد قبل از روز دهم در گروه aGVHD+ به حداکثر می‌رسند.

- میانگین غلظت IL-18 و IL-2R با روزهای شروع جایگزینی (engraftment) نوتروفیلی و پلاکت‌هادر ارتباط نمی‌باشند.



شکل ۱- میانگین غلظت سرمی (pg/ml IL-18) قبل از پیوند و در روزهای مختلف پس از پیوند بر حسب GVHD Grading



شکل ۲- میانگین غلظت سرمی (U/ml IL-2R) قبل از پیوند و در روزهای مختلف پس از پیوند بر حسب GVHD Grading

## بحث

(۹) نشان دادند که افزایش غلظت IL-2R در ۱۶ نفر از ۱۹ فرد مبتلا به aGVHD (۸۲/۴٪) نسبت به شروع علائم پیشی می‌گیرد که در این مطالعه مشخص گردید افزایش غلظت IL-2R در ۶۸٪ موارد (در روز دهم پس از پیوند) بر شروع علائم aGVHD (در روز پانزدهم پس از پیوند) پیشی می‌گیرد.

Kubayashi و همکاران نیز کاهش غلظت IL-2R پس از شروع علائم را مطرح کردند. در مطالعه حاضر نیز کاهش غلظت این دو عامل در برخی از بیماران GVHD+ با پیشرفت درمان مشاهده گردید، آنها این امر را به وضعیت بیماری (Statue Disease) نسبت دادند (۱۴). که احتمالاً با کاهش عوارض و شدت عوارض غلظت این دو عامل کاهش یافته است.

نتایج مطالعه حاضر که بیانگر تفاوت غلظتهای IL-18 و IL-2R قبل از پیوند در دو گروه بیماران aGVHD<sup>-</sup> و aGVHD<sup>+</sup> و به حداکثر رسیدن آنها در ۶۰٪ موارد قبل از بروز علائم و عوارض aGVHD بوده، همانند سایر مطالعات انجام شده موید دخالت این دو عامل در پاتوژنز این عارضه بوده و با توجه به افزایش غلظت IL-18 بر حسب GVHD grading که مشابه نتیجه Fujuhara (۱) است، این عامل احتمالاً میتواند به عنوان Prognosis Factor برای aGVHD مطرح شود.

پیشنهاد می‌گردد مطالعه کاملتری از طریق بررسی ژن‌های این دو عامل نیز صورت پذیرد.

### تشکر و قدردانی

هزینه‌های این تحقیق توسط مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغزاستخوان، بیمارستان دکتر شریعتی و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تامین شده است.

بدینوسیله نویسندگان این مقاله از سرکار خانمها فروغ اعظم طرابادی، سیمیندخت بهیر پناه، اشرف السادات موسوی، سهیلا خلیلووند و زهرا شهریاری و زهرا یکتا بخاطر همکاری در این طرح تشکرات خود را ابراز میدارند.

نتایج این مطالعه نشان دادند غلظت اینترلوکین ۱۸ (IL-18) و پذیرنده محلول اینترلوکین ۲ (sIL-2R) در بیماران تحت پیوند مغز استخوان که به بیماری حاد پیوند علیه میزبان (aGVHD) مبتلا شدند، قبل از پیوند نیز نسبت به گروه کنترل و بیماران تحت پیوند مغز استخوان فاقد این عارضه، بیشتر میباشند و در اکثر افراد مبتلا به این عارضه در روز دهم پس از پیوند به حداکثر میزان خود رسیده‌اند و غلظت اینترلوکین ۱۸ با شدت این عارضه ارتباط دارد. این ازدیاد غلظت احتمالاً بیانگر افزایش فعالیت لنفوسیت‌های TH1 در این گروه می‌باشد.

aGVHD عارضه‌ای است که در آن لنفوسیت‌های TH1 فعالیت بارزتری دارند (۱). پاتوفیزیولوژی aGVHD در برگیرنده آبشار سایتوکائینهای التهابی TH1 (۱۲) و پاسخ لنفوسیت‌های T دهنده علیه آلوآنتی‌ژنهای میزبان است (۹). فعال شدن لنفوسیت‌ها دارای ویژگی‌هایی می‌باشد از جمله مطرح شده IL2Ra از سطح لنفوسیت‌های فعال آزاد میگردد (۱۰، ۱۳) تولید IL-18 نیز که سایتوکائینی التهابی با قدرت تحریک شدید لنفوسیت‌های TH1 و القاکننده فعالیت سلولهای Tc می‌باشد (۱۴) افزایش می‌یابد. گزارشات متعدد نیز بیانگر افزایش ترشح این عوامل طی وقوع aGVHD پس از BMT میباشند (۱۲، ۱۴، ۱۵).

بالا بودن غلظت IL-18 در افراد aGVHD<sup>+</sup> نسبت به aGVHD<sup>-</sup> مشابه نتایج حاصله توسط Ju و همکاران (۷) می‌باشد، آنان گزارش کردند که غلظت این سایتوکائین با شدت aGVHD نیز مربوط است. Nakamura و همکاران (۱۱) در مطالعه خود مقادیر IL-18، IL2R، و IFN- $\gamma$  را در سرم ۱۸ بیمار تحت BMT آلونژیک بررسی نموده و گزارش کردند که فقط مقدار IL-2R با شدت GVHD در ارتباط است. در حالیکه مطالعه حاضر نشان داد که مقدار IL-2R با شدت GVHD مرتبط نمی‌باشد. Foley و همکاران