

اثر عوارض دیررس ریوی گاز خردل بر فعالیت آنزیمهای سیستم آنتی اکسیدانی

مجید شهرتی Ph.D^{*}، مصطفی قانعی M.D^{*}، نواب شمس پور Msc^{**}، مهوش جعفری Ph.D^{***}،
جعفر اصلانی M.D^{***}، علی اکبر فسحمی نوروژی Msc^{****}

چکیده

هدف: بررسی فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز در پلاسما جانبازان شیمیایی با عوارض دیر رس ریوی ناشی از خردل.

مواد و روش‌ها: فعالیت اختصاصی آنزیمهای کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز به ترتیب با استفاده از روش‌های Cohen و Paoletti در نمونه پلاسما جانبازان شیمیایی و گروه شاهد اندازه گیری و مقایسه شد.

یافته‌ها: تفاوت معنی داری در فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز بین دو گروه شاهد و جانبازان شیمیایی مشاهده شد ($p=0.01$). اما اختلاف معنی داری بین دو گروه در فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مشاهده نگردید ($p=0.339$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از مطالعه، فعال شدن آنزیم کاتالاز ممکن است در پیشرفت التهاب و آسیبهای ریوی ناشی از خردل نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ریه، گاز خردل، سیستم آنتی اکسیدانی، کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز

دریافت مقاله: ۸۷/۱/۲۹ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۱

✉ نویسنده مسئول: استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، پژوهشکده طب نظامی - مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی
* استاد دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، پژوهشکده طب نظامی - مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی
** پژوهشگر، پژوهشکده طب نظامی - مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی
*** استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، پژوهشکده طب نظامی - مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی
**** دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، پژوهشکده طب نظامی - مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی
***** پژوهشگر، پژوهشکده طب نظامی - مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی.

مقدمه

بعد از گذشت حدود ۹۰ سال از اولین کاربرد سولفور موستارد یا گاز خردل به عنوان سلاح شیمیایی این عامل بدلیل اثرات مخرب بر روی بافت‌های مختلف بدن و عدم وجود پادزهر مناسب و موثر بر علیه آن همچنان به عنوان یک عامل خطرناک در جنگ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱ و ۲). این عامل در جنگ تحمیلی ۸ ساله عراق علیه ایران به دفعات به میزان وسیعی توسط نیروهای عراقی بر علیه نظامیان و غیر نظامیان مورد استفاده قرار گرفت و تلفات و ضایعات انسانی زیادی ایجاد کرد (۳).

گاز خردل یک عامل آلکیله کننده بسیار قوی و غیر اختصاصی است که قادر است به کلیه بافت‌ها آسیب‌های شدیدی وارد نماید. ضایعات ناشی از گاز خردل را می‌توان به دو دسته زود رس و دیر رس تقسیم بندی کرد. ضایعات زود رس که عمدتاً ناشی از تماس با غلظت‌های نسبتاً بالای عامل ایجاد می‌شود بصورت ضایعات پوستی، چشمی و تنفسی و سیستم اعصاب ظاهر می‌شود که در صورت شدید بودن باعث مرگ مصدوم می‌شود (۴). در صورتی که عوارض دیر رس خردل عمدتاً بر روی دستگاه تنفسی مصدوم متمرکز است (۵).

متاسفانه تاکنون درمان قطعی برای عوارض دیررس بدلیل عدم شناخت مکانیسم‌های دقیق ایجاد ضایعات دیررس ناشی از خردل وجود نداشته است و در اغلب موارد ضایعات دیررس ناشی از گاز خردل بصورت علامتی درمان می‌شود.

در افراد نرمال با دستگاه تنفسی سالم، تعادل بین آنتی اکسیدانها و اکسیدانها وجود دارد (۶). افزایشی در غلظت اکسیدانها یا افت آنتی اکسیدانها منجر به از دست رفتن این تعادل و بوجود آمدن حالتی بنام استرس اکسیداتیو می‌شود (۷). بنظر می‌رسد استرس اکسیداتیو نقش مهمی را در پاتوژنز بیماریهای ریوی از طریق آسیب مستقیم، یا درگیر کردن مکانیسم‌های مولکولی موثر در التهاب ریه داشته باشد (۷).

تعدادی از مطالعات افزایش بار اکسیدانی و به دنبال آن افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو را در مجاری هوایی، خون و ادرار سیگاری‌ها و بیماران مبتلا به بیماریهای ریوی نشان دادند (۸-۶). با توجه به وجود عوارض ریوی در جانبازان شیمیایی و عدم تعادل

اکسیدان / آنتی اکسیدان در بیماریهای ریوی هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنزیمهای سیستم آنتی اکسیدان کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز خارج سلولی در جانبازان شیمیایی با تشخیص عارضه ریوی ناشی از خردل است .

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد شاهدهی، مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، در سال ۱۳۸۵ در شهرستان سر دشت به منظور بررسی فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در جانبازان شیمیایی دارای مشکلات ریوی انجام شد. ۳۰۰ مصدوم شیمیایی جنگ تحمیلی بر اساس پرونده‌های موجود در کلینیک بنیاد جانبازان شهرستان سردشت جهت ورود به مطالعه اعلام آمادگی کردند. بر اساس اینکه سابقه مواجهه با گاز خردل در آنها قطعی باشد و همچنین تشخیص بیماری مزمن ریه با توجه به یافته‌های کلینیکی و پاراکلینیکی در آنها تأیید شده باشد و در یک کارآزمایی بالینی دیگر به طور همزمان شرکت نداشته باشند و تحت درمان با داروهای تداخل کننده قبل از آغاز مداخله نباشد ۲۲۰ جانباز شیمیایی وارد مطالعه شدند. همچنین ۲۰ نفر از کسانی که سابقه کشیدن سیگار و بیماریهای قلبی و سرطان ریه و یا سابقه فامیلی آسم در آنها وجود داشت از مطالعه خارج شدند. همچنین ۶۰ نفر داوطلب غیر سیگاری سالم دارای عدم شرایط خروج از مطالعه به عنوان گروه کنترل از ساکنین حومه شهر سر دشت که در معرض گاز خردل نبوده اند به طور تصادفی انتخاب و وارد مطالعه شدند. از افراد وارد شده به مطالعه پس از توضیحات لازم در مورد اهداف طرح موافقت کتبی جهت شرکت در مطالعه اخذ گردید.

از تمامی شرکت کنندگان در مطالعه ۵ میلی لیتر خون سیاهرگی برای اندازه گیری فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز بعد از ۱۰-۱۲ ساعت گرسنگی در بین ساعت ۰۸:۳۰ تا ۱۰:۳۰ جمع آوری شد پلاسمای نمونه خون اخذ شده از شرکت کنندگان در مطالعه وسیله دستگاه سانتریفوژ جداسازی شد و نمونه‌های پلاسمایی جمع آوری شد تا زمان اندازه گیری در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد.

سنجش فعالیت کاتالاز:

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش cohen استفاده شد (۹). واکنش با افزودن ۶ میلی مولار H_2O_2 به نمونه پلاسما در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با PH برابر ۷ شروع شد. بعد از ۳ دقیقه واکنش با اضافه کردن ۶ نرمال متوقف شد. سپس پر منگنات ۰/۰۱ نرمال اضافه گردید و جذب نمونه‌ها بلا فاصله در طول موج ۴۸۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت کاتالاز مقدار یک میکرومول از H_2O_2 که در یک دقیقه تجزیه می شود. فعالیت ویژه کاتالاز بر حسب واحد بر لیتر بیان شد.

بتا مریکاپتو اتانل ۱۰ میلی مولار اضافه شد. کاهش جذب درست ۵ دقیقه بعد قرائت شد. یک واحد فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی است که نیاز است تا ۵۰٪ از سرعت اکسیداسیون NADH مهار شود. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر لیتر بیان می شود. NADH ساخت شرکت سیگما و بقیه مواد مصرفی مورد استفاده در این مطالعه ساخت شرکت مرک آلمان بود. آنالیز داده‌ها بوسیله نرم افزار SPSS 13 انجام شد و مقایسه بین گروهها بر اساس آزمون تی مستقل (پارامتری) انجام شد.

نتایج

اختلاف معنی داری بین گروه‌ها از نظر سن، قد و وزن ($p > 0.05$) وجود نداشت. (جدول شماره یک) متوسط تعداد تنفس در دقیقه در گروه جانبازان شیمیایی $17/0 \pm 17/41$ بود. ۶۴ نفر (۳۲ درصد) دارای تنگی نفس شدید و ۱۵ نفر (۷۵ درصد) بیشتر از ۲ بار در هفته بعلت تنگی نفس از خواب بیدار می شدند. همچنین ۳۹ نفر (۱۹/۵ درصد) دارای سرفه‌های شدید بودند که موجب اختلال در کار روز مره آنان می شد. ۱۸۷ نفر (۹۳/۵ درصد) از بوجود آمدن خلط شکایت داشتند که ۶ نفر (۰/۳ درصد) از کل بیماران مورد مطالعه از خلط خونی رنج

سنجش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز خارج سلولی:

برای سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از روش Paoletti استفاده شد (۱۰). ۰/۸ میلی لیتر بافر TDH (تری اتانول آمین - دی اتانول آمین - اسید کلریدریک) با PH برابر ۰/۴۷، ۴۰ میکرو لیتر NADH/5 میلی مولار، ۲۵ میکرو لیتر EDTA/MnCl₂ (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) و ۱۰۰ میکرو لیتر نمونه پلاسما به یک کووت اضافه شد و بعد از مخلوط کردن مدتی به حال خود گذاشته شد تا جذب آن در ۳۴۰ نانومتر ثابت شود. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر محلول

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین سن، قد و وزن در دو گروه مورد (بیمار) و گروه سالم (شاهد)

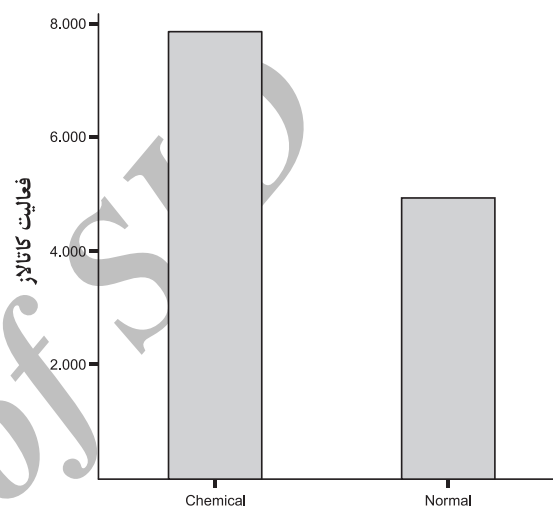
متغیرها	گروه مورد (بیمار) (۲۲۰)	گروه شاهد (سالم) (۶۰ نفر)	P
سن (Year)	۴۵/۹ ± ۱۰/۳	۸/۴ ± ۴۳/۱۴	۰/۳۰۶
قد (cm)	۸/۵ ± ۱۷۵/۷	۵/۶ ± ۱۷۳/۱	۰/۷۶۴
وزن (Kg)	۱۲/۳ ± ۷۴/۹	۱۵/۸ ± ۶۸/۲۳	۰/۲۷۸

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در نمونه پلاسمای جانبازان شیمیایی گروه شاهد

آنزیمهای مورد مطالعه	گروههای مورد مطالعه	میانگین ± انحراف معیار (واحد بر لیتر)	P-VALUE
آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز	شاهد	۱۰/۸۳ ± ۷۰/۵۵	۰/۳۳
آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز	جانبازان شیمیایی	۷/۰۸ ± ۶۹/۴۷	
آنزیم کاتالاز	شاهد	۱/۵۲ ± ۴/۹۳	۰/۰۱
آنزیم کاتالاز	جانبازان شیمیایی	۱/۷۱ ± ۷/۸۵	

می‌برند.

متوسط فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه سرمی خون جانبازان شیمیایی اختلاف معنا داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P=0.01$) ولی اختلاف معنا داری بین گروه جانبازان شیمیایی با گروه شاهد در مقدار فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز ($P=0.33$) دیده نشد. (جدول ۱)



نمودار شماره یک - متوسط فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه کنترل و جانبازان شیمیایی

بحث

در این مطالعه فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان می‌دهد در حالی که بین گروه جانبازان شیمیایی با عوارض دیررس ریوی ناشی از خردل و گروه شاهد در فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز خارج سلولی اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در مطالعات قبلی افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در طیف وسیعی از بیماریهای ریوی نیز گزارش شده است (۱۱) اگرچه در مطالعه‌ای که توسط Varshavskii و همکارانش صورت گرفت متوقف شدن فعالیت این آنزیم در بیماران آسمی نشان داده شد (۱۲). بسیاری از مشاهدات و مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که رادیکالهای آزاد نقش مهمی را در پاتونز بیماریهای ریوی مانند

بیماریهای مزمن انسدادی ریه و آسم برعهده دارند (۱۳). رادیکالهای آزاد، مولکولهایی هستند که از نظر شیمیایی بسیار فعال می‌باشند و تولید این رادیکالها یک فرایند طبیعی طی واکنشهای متابولیسمی در بدن می‌باشد. رادیکالهای آزاد از طریق سیستم آنتی اکسیدانی از بدن دفع می‌شوند (۱۴). سیستم آنتی اکسیدانی بر علیه رادیکالهای آزاد به دو قسمت عمده آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شود. قسمت آنزیمی شامل سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون S ترانسفراز و تیوردوکسین است و قسمت غیر آنزیمی شامل پروتئینهایی مانند سرولوپلاسمین، متالوتوئین، آلبومین، ترانسفرین، فریتین و میوگلوبین برای نقل و انتقالات الکترونیهای فلزات واسطه برای به دام انداختن رادیکالهای آزاد است (۱۵). آنزیم کاتالاز که میل ترکیبی بالایی با پراکسید هیدروژن دارد، وظیفه خنثی کردن پراکسید هیدروژن و تبدیل آن به آب و اکسیژن مولکولی را در سرم و بافت انسان بر عهده دارد (۱۵). همچنین سوپر اکسید دیسموتاز متالوآنزیمی است که اولین آنتی اکسیدان طبیعی از زنجیره دفاع موجود زنده در مقابل سمیت رادیکال سوپر اکسید است. این آنزیم تبدیل رادیکال سوپر اکسید را به هیدروژن پراکسید و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند (۱۵).

عدم تعادل بین تاثیر دفاعی آنتی اکسیدانی و افزایش تولید رادیکالهای آزاد باعث بوجود آمدن حالت استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۴). استرس اکسیداتیو در نتیجه افزایش تولید اکسیدانهایی مثل اکسیژن فعال بوجود می‌آید. در بسیاری از بیماریهای ریوی این عدم تعادل موجب آسیب رساندن به طیف وسیعی از بیومولکولهایی زیستی در ریه گشته است که ارتباط بسیار نزدیکی می‌تواند با پاتونز بیماریهای ریوی داشته باشد (۱۴).

افزایش میزان آنزیم کاتالاز نشان دهنده افزایش غلظت پراکسید هیدروژن (۱۴) و نهایتاً نشان دهنده وجود استرس اکسیداتیو می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز افزایش آنزیم کاتالاز در بیماران شیمیایی با عوارض دیررس ریوی نیز ممکن است ناشی از افزایش پراکسید هیدروژن باشد. اثبات این نظریه از این جهت اهمیت دارد که افزایش پراکسید هیدروژن می‌تواند باعث غیر فعال شدن آنزیم مسوول این واکنش یعنی سوپر اکسید دیسموتاز شود (۱۲). اگرچه در مطالعه

CRC Press 1991.

3. Reports of specialists appointed by the Secretary General to investigate allegations by the Islamic Republic of Iran concerning the use of chemical weapons. 1986, New York Security Council of United Nations document S/16433.

4. Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Hains D. Incidence of lung, eye and skin lesions on late complications in 34,000 Iranian with wartime exposure to mustard agent. *J Occu Environ Med* 2003; 45:1136-43.

5. Ghanei M, Mokhtari M, Mir Mohammad M, Aslani J. Bronchiolitis obliterans following exposure to sulfur mustard: chest high resolution computed tomography, *Eur J Radiol* 2004; 52:164-9

6. Sies H. Antioxidant functions of vitamin E, and C, b-carotene, and other carotenoids. *Ann New York Acad Science* 1992; 669: 7-20.

7. Adamson IY, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 1974; 77: 185-97.

8. MACNEE W: Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 50-60.

9. Cohen G, Dembiec D, marcus, J, Measurement of catalase activity in tissue extract. *Analytical biochemistry* 1970; 34: 30-8.

10. Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity purely chemical system based on NADPH oxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 209-20.

11. Allen RG, Tresini M, Keogh BP, Doggett DL, Cristofalo VJ. Differences in electron transport potential,

حاضر سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد اما همین نکته نشان دهنده متغیر بودن این آنزیم و اثبات دیگری بر وجود استرس اکسیداتیو در بیماران مورد مطالعه حاضر است زیرا آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز خارج سلولی در بیماریهای ریوی با توجه به شدت بیماری افزایش (۱۴) یا کاهش نشان داده است (۱۲).

با توجه به تغییرات ایجاد شده در بیماران با مشکلات ریوی ناشی از خردل می توان چنین نتیجه گرفت که التهاب ایجاد شده بر اثر عوارض دیر رس گاز خردل ممکن است در ایجاد رادیکال آزاد و تخریب سیستم آنتی اکسیدانی و در نهایت ایجاد مشکلات ریوی نقش داشته باشد (۱۴) اگرچه در مطالعه ای پیش از این نقش گونه های فعال اکسیژن در عوارض دیر رس چشمی ناشی از خردل و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه پلاسمای بیماران دارای عوارض دیر رس چشمی ناشی از خردل نیز گزارش شده بود (۱۵).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان می دهد. هرچند که اختلاف معنی داری بین آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در گروه بیماران و شاهد دیده نشد. اما هر دو این نتایج دلیلی بر وجود داشتن حالت استرس اکسیداتیو در جانبازان شیمیایی با عوارض ریوی دیر رس ناشی از خردل می باشد. با توجه به موارد فوق می توان به این بیماران خاص توصیه نمود که برای کاهش آسیب ناشی از رادیکال های آزاد و تقویت سیستم آنتی اکسیدانی از آنتی اکسیدانهای مکمل ویا داروهای آنتی اکسیدانی استفاده کنند. همچنین باید مطالعاتی درباره پارامترهای دیگر درگیر در سیستم آنتی اکسیدانی بویژه در مایع لاواژ این بیماران صورت گیرد.

References

1. Willems JL. Clinical management of mustard gas casualties. *Ann Med Militar* 1989; Suppl 3: 1-45.
2. Papirmeister B. *Med Defense against Mustard Gas*.

antioxidant defences, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J Cell Physiol* 1999; 180:114–22.

12. Varshavskii BIA, Trubnikov GV, Galaktimpva LP, Koreniak NA, Koledeznaia IL, Oberemok AN. Oxidant–antioxidant status of Patients with bronchial asthma during in halation and systemic glucocorticoid therapy. *Ter Arh* 2003; 75: 21–4.

13. Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med* 2005; 4:175–200.

14. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic. Biol. Med* 1996; 21:669–81.

15. Fridovich I, Freeman B. Antioxidant defenses in the lung. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 693–702.

۱۶. خسرو جدیدی و همکاران. نقش گونه‌های فعال اکسیژن در عوارض دیررس چشمی ناشی از خردل. *طب نظامی*، بهار ۱۳۸۴، شماره ۷، صفحات ۹–۱۴.

Archive of SID