

## تحقیقی

## فنوتیپ و فعالیت آلفایک آنتی تریپسین در پلاسمای جانبازان شیمیایی ناشی از عوارض دیررس گاز خردل

دکتر مجید شهری\*<sup>۱</sup>، نواب شمس پور<sup>۲</sup>، دکتر افشین محسنی فر<sup>۳</sup>، دکتر مصطفی قانعی<sup>۴</sup>

- ۱- متخصص فارماکوتراپی، دانشیار گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی.  
 ۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، مؤسسه آموزش عالی هلال احمر ایران، تهران. ۳- متخصص بیوشیمی بالینی، استادیار گروه سم شناسی دانشگاه تربیت مدرس.  
 ۴- فوق تخصص ریه، استاد گروه داخلی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی.

### چکیده

**زمینه و هدف:** نقص و کمبود فعالیت آلفایک آنتی تریپسین در بیماری‌های مزمن انسدادی ریه به عنوان یکی از عوامل اتیولوژیک شناخته شده است. این مطالعه به منظور تعیین فنوتیپ‌ها و فعالیت آلفایک آنتی تریپسین در پلاسمای جانبازان شیمیایی ناشی از عوارض دیررس گاز خردل انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه کوهورت تاریخی روی ۱۰۰ جانباز شیمیایی جنگ تحمیلی ناشی از بمباران با گاز خردل در شهر سردشت طی تیرماه ۱۳۶۶ و ۵۰ داوطلب سالم غیرسیگاری با سابقه عدم مواجهه با گاز خردل (گروه کنترل)، طی سال ۱۳۸۶ انجام شد. جانبازان دچار آسیب‌های ریوی ناشی از گاز خردل بودند. فنوتیپ آلفایک آنتی تریپسین و همچنین فعالیت ظرفیت مهارتی تریپسین اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه فنوتیپ طبیعی MM را دارا بودند؛ ولی میانگین ظرفیت مهارتی تریپسین در گروه کنترل ۴/۲±۰/۱ میکرومول بردقیقه بر میلی‌لیتر به دست آمد که بیشتر از گروه جانبازان شیمیایی (۳/۶±۰/۳ میکرومول بردقیقه بر میلی‌لیتر) بود ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که فعالیت آلفایک آنتی تریپسین در جانبازان شیمیایی ناشی از مواجهه با گاز خردل کاهش یافته است.

**کلید واژه‌ها:** آلفایک آنتی تریپسین، جانبازان شیمیایی، گاز خردل

\* نویسنده مسؤل: دکتر مجید شهری، پست الکترونیکی: shohratimajid@yahoo.com

نشانی: تهران، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی

تلفن: ۸۸۲۱۱۵۲۴ (۰۲۱)، نمابر: ۸۸۲۱۱۵۲۴

وصول مقاله: ۸۷/۱۱/۱۹، اصلاح نهایی: ۸۸/۶/۲۱، پذیرش مقاله: ۸۸/۷/۱۳

## مقدمه

بعضی اشکال این آنزیم در بدن چنان غیرفعال می‌باشند که به عنوان نقص آلفایکت آنتی تریپسین شناخته می‌شوند. افرادی که دارای فنوتیپ‌های غیرطبیعی آلفایکت آنتی تریپسین باشند (۳)؛ مستعد ابتلاء به بیماری‌های التهابی چشم، ریوی، کبدی، نقص سیستم کمپلمان و ایمنی و بیماری‌های کلیوی می‌باشند. از آنجا که نقص و کمبود فعالیت آلفایکت آنتی تریپسین در بیماری‌های مزمن انسدادی ریه به عنوان یکی از عوامل اتیولوژیک شناخته شده است (۴)؛ این مطالعه به منظور بررسی فنوتیپ و فعالیت آلفایکت آنتی تریپسین در پلاسمای جانبازان شیمیایی ناشی از عوارض دیررس گازخردل انجام شد.

## روش بررسی

این مطالعه کوهورت تاریخی روی ۱۰۰ جانبازان شیمیایی جنگک تحمیلی ناشی از بمباران با گازخردل در شهر سردشت طی تیرماه ۱۳۶۶ و ۵۰ داوطلب سالم غیرسیگاری با سابقه عدم مواجهه با گاز خردل که در همان منطقه ساکن بودند (گروه کنترل)؛ طی سال ۱۳۸۶ انجام شد. عوارض ریوی براساس پرونده‌های موجود در کلینیک شهر سردشت مشخص گردید. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) مورد تصویب قرار گرفت. پس از معرفی و توضیح کامل طرح برای بیماران از آنان موافقت کتبی گرفته شد.

از شرایط ورود به مطالعه تأیید مسمومیت ریوی با گاز خردل بود. برای اثبات مسمومیت فرد با گازخردل پس از گرفتن شرح کامل تاریخچه پزشکی و نحوه مواجهه بیمار با گازخردل از مدارک موجود در خصوص مواجهه فرد با گازخردل شامل مستندات مسمومیت و اثبات وجود تاول‌های پوستی و مشکلات چشمی ناشی از گازخردل استفاده شد. همچنین وجود اختلالات تنفسی در بیمار با توجه به یافته‌های بالینی و فرابالینی، سن بین ۲۰ تا ۷۰ سال، تمایل بیمار برای شرکت در طرح براساس موافقت کتبی از دیگر شرایط ورود به مطالعه بود. همچنین ضوابط خروج از مطالعه شامل ابتلاء فرد به کارسینوم برونکوژنیک، مصرف سیستمیک کورتیکواستروئیدها به صورت مداوم، تأیید یا شک به وجود پنومونی یا برونشیت چرکی حاد در طی ماه اخیر و اعتیاد به سیگار و یا هرگونه ماده مخدر بود.

سولفور موستارد از عوامل آلکیله کننده تاول‌زا است. این عامل یک الکتروفیل قوی است که به آسانی با طیف وسیعی از ماکرومولکول‌های سلولی مانند DNA و RNA و پروتئین واکنش داده و موجب آسیب شدید به بافت‌های بدن می‌شود. ضایعات ناشی از گاز خردل را به دو دسته زودرس و دیررس می‌توان تقسیم‌بندی کرد. ضایعات زودرس عمدتاً ناشی از تماس با غلظت‌های نسبتاً بالای عامل ایجاد شده و به صورت ضایعات پوستی، چشمی و تنفسی و سیستم اعصاب ظاهر می‌شود که در صورت شدید بودن باعث مرگ مصدوم می‌گردد (۱). عوارض دیررس گازخردل به طور عمده روی دستگاه تنفسی متمرکز است. مواجهه تک دوز اما شدید با موستارد می‌تواند؛ مشکلاتی مانند برونشیت مزمن در طولانی مدت ایجاد نماید (۱). اگرچه سولفور موستارد نزدیک به یک‌قرن است که به عنوان سلاح شیمیایی مطرح شده؛ اما هنوز مکانیسم بیوشیمیایی آن دقیقاً روشن نشده است. از طرف دیگر اثرات گاز خردل سریع و غیراختصاصی است و به همین دلیل درمان خاصی برای آن به خصوص عوارض دیررس ناشی از آن وجود ندارد (۱).

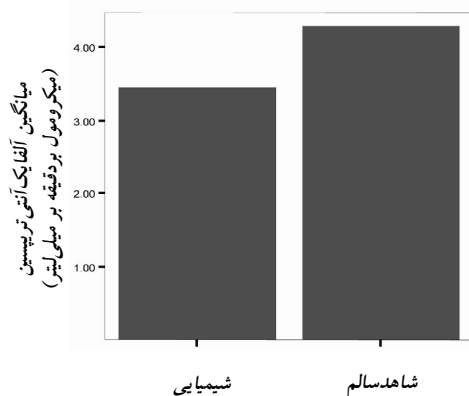
در طی جنگک تحمیلی، عراق بارها گاز خردل را بر علیه مردم نظامی و غیرنظامی کشورمان به کار گرفت و مسمومیت ده‌ها هزار ایرانی را به دنبال داشت. اگرچه برطبق آخرین آمار، این جمعیت ۴۰ هزار نفر بودند؛ اما بادر نظر گرفتن روند مراجعات مدعیان مسمومیت شیمیایی و احراز جانبازی در سهمی از آنان، به نظر می‌رسد که حدود ۱۰۰ هزار جانباز شیمیایی در ایران زندگی می‌کنند (۱). امروزه تعداد زیادی از جانبازان شیمیایی از عوارض مزمن ریوی دیررس گازخردل رنج برده و طیف وسیعی از بیماری‌های ریوی از گروه بیماری‌های مزمن انسدادی ریه را شامل می‌شود (۱).

آلفایکت آنتی تریپسین یکی از مهم‌ترین سیستم‌های دفاعی بدن و ریه در مقابله با مواد سمی است و نقص کمی و یا کیفی این ماده در بدن موجب شدت ضایعات وارده به ریه می‌گردد (۲). فنوتیپ‌های آلفایکت آنتی تریپسین بسته به آلل‌های آن می‌تواند به صورت MS، MZ و MM باشد؛ همان‌طور که ژنوتیپ آن می‌تواند به صورت ZZ و یا SS باشد. در حقیقت

میکرومول بردقیقه بر میلی لیتر) بود ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۱).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار سن، قد و وزن افراد مورد مطالعه در گروه‌های شیمیایی با گاز خردل و گروه شاهد سالم

ارزش P	گروه شاهد سالم (۵۰ نفر)	شیمیایی با گاز خردل (۱۰۰ نفر)	گروه متغیر
سن (سال)	۴۳/۱۴±۸/۴	۴۶/۲±۱۰/۹	۰/۳۰۶
قد (سانتی متر)	۱۷۳/۱±۵/۶	۱۷۵/۷±۸/۵	۰/۷۶۴
وزن (کیلوگرم)	۶۸/۲۳±۱/۸	۷۹/۴±۱/۳	۰/۲۷۸



نمودار ۱: میانگین ظرفیت مهارت تریپسین در گروه شیمیایی با گاز خردل در مقایسه با گروه شاهد سالم

## بحث

میزان سرمی فعالیت مهارت تریپسین (ظرفیت معادل مقدار توانایی مایعات فیزیولوژیک و بافت‌ها برای مهار آنزیم‌های پروتئاز) در گروه بیماران ریوی ناشی از مواجهه با گاز خردل کمتر از گروه شاهد بود.

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تاثیر دراز مدت گاز خردل بر فعالیت آلفایک آنتی تریپسین انجام نشده است؛ اما تحقیقات متعددی بر میزان فعالیت آلفایک آنتی تریپسین در بیماری‌های ریوی ناشی از دود سیگار در سطوح سرمی و مایع لاواژ برونکوآلوئولار صورت گرفته است. تقریباً تمامی مطالعات بر این مسأله اتفاق نظر دارند که کشیدن سیگار باعث کاهش فعالیت آلفایک آنتی تریپسین و ظرفیت مهارت الاستاز نوتروفیلی سیستم تنفسی تحتانی می‌شود (۷و۶).

نتایج مطالعات نشان داده که سیگار با کاهش ظرفیت

نمونه خون افراد مورد مطالعه توسط سرنگ هپارینه گرفته شد و با دور ۲۵۰۰ در ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. پلاسما حاصل از سانتریفوژ توسط میکروپیپت جدا شد و در تیوب‌های یک میلی لیتری در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. همچنین توسط سرنگ جداگانه‌ای ۳ سی سی خون لخته برای انجام آزمایشات بیوشیمی گرفته شد (۵).

فنون تیپ آلفایک آنتی تریپسین بر روی نمونه‌های پلاسما و با استفاده از روش ایزوالکتریک کانونی بر روی ژل پلی اکریلامید انجام شد. بدین طریق تعیین فنوتیپ‌های مختلف آلفایک آنتی تریپسین با استفاده از نمای الکتروفور تیک نمونه‌ها امکان پذیر بود. همچنین ظرفیت مهارت تریپسین پلاسما در همه نمونه‌ها به وسیله اسپکتروفتومتری به روش مهار آنزیمی براساس مهار تریپسین اندازه گیری شد (۵).

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-13 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون آماری تی مستقل و برای ارزیابی همبستگی از ضریب پیرسون استفاده شد. ضریب اطمینان مطالعه ۹۵ درصد ( $\alpha < 0/05$ ) تعیین شد.

## یافته‌ها

میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۴۶/۲±۱۰/۹ (محدوده ۶۰-۲۵ سال) بود. بین دو گروه از لحاظ وزن و قد اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۱). در تمامی بیماران ۲۰ سال از زمان مواجهه با گاز خردل می گذشت.

در گروه شیمیایی با گاز خردل، ۳۲ درصد دارای تنگی نفس شدید بودند و ۸ درصد بیشتر از ۲ بار در هفته به علت تنگی نفس از خواب بیدار می شدند. ۲۰ درصد دارای سرفه‌های شدید بودند که موجب اختلال در کار روزمره آنان شده بود. ۹۴ درصد از به وجود آمدن خلط شکایت داشتند و ۶ درصد از کل بیماران مورد مطالعه از خلط خونی رنج می بردند.

تمامی افراد شرکت کننده در این مطالعه فنوتیپ طبیعی MM را دارا بودند؛ ولی میانگین ظرفیت مهارت تریپسین در گروه کنترل ۴/۲±۰/۱ میکرومول بردقیقه بر میلی لیتر به دست آمد که بیشتر از گروه جانبازان شیمیایی ۳/۴±۰/۳

مهارى الاستاز نوتروفیلی سیستم تنفسى تحتانی مرتبط است (۶). مطالعه‌ای اکسیدشدن متیونین و کاهش فعالیت آلفایک آنتی‌تریپسین ریوی افراد سیگاری را نشان داده است (۸). همچنین طی یک مطالعه مروری در سال ۱۹۹۵ اهمیت فعالیت الاستینولیتیک در پاتوژنز آمفیزم و آسیب آلفایک آنتی‌تریپسین ناشی از سیگار در مایع لاواژ ریه تاکید گردید و مشخص شد که سیگار و سلول‌های التهابی منابع غنی از اکسیدان و عوامل موثر اکسیدکننده دفاع آنتی‌پروتئازی سیستم تنفسى تحتانی هستند (۹). ولی با این وجود در مطالعه انجام شده در سال ۱۹۸۲، بررسی اثر سیگار روی غلظت و فعالیت آلفایک آنتی‌تریپسین سرمی، نشان داد که هیچ تغییری در غلظت آلفایک آنتی‌تریپسین سرمی مشاهده نشده است؛ ولی با وجود این میزان سرمی فعالیت مهارى تریپسین سرمی کاهش یافته بود (۱۰).

مهم‌ترین نقش آلفایک آنتی‌تریپسین مهار الاستاز ناشی از نوتروفیل‌ها می‌باشد که در فضای خارج سلولی رها شده و موجب تخریب رشته‌های الاستین در بافت‌های مختلف به خصوص حبابچه‌های ریوی می‌شود (۱۱). فرضیه عدم تعادل پروتئاز-آنتی‌پروتئاز بیان می‌کند که یک عدم تعادل بین دفاع آنتی‌الاستازی ریه (آلفایک آنتی‌تریپسین) و به دنبال آن افزایش عملکرد الاستازهای لکوسیتی (الاستاز نوتروفیلی) منجر به تخریب الاستین و سایر اجزای ماتریکس خارج سلولی سیستم تنفسى تحتانی می‌شود (۱۲). بر مبنای آنچه گذشت این فرضیه روی شواهدی که آلفایک آنتی‌تریپسین یک دفاع آنتی‌الاستازی بزرگ در فضاهای آلوئلی می‌باشد؛ پایه‌ریزی شده است (۷). افراد با نقص شدید آلفایک آنتی‌تریپسین به علت کاهش این پروتئین در آلوئل‌ها مستعد ایجاد انسدادهای ریوی هستند. اگرچه فنوتیپ‌های آلفایک آنتی‌تریپسین که به عنوان عامل خطری برای بیماری‌های ریوی مطرح می‌شوند؛ آتهایی هستند که جزو الل‌های ناقص بوده و به حالت‌های هموزیگوت یا هتروزیگوت قرار دارند (۸). اما در این مطالعه نقص در عملکرد فعالیت آلفایک آنتی‌تریپسین به علت نقص فنوتیپ‌ها نبود؛ بلکه بر اثر عوارض دیررس ناشی از گاز خردل ایجاد شده بود.

اساس تئوری پروتئاز / آنتی‌پروتئاز پاتوژنز بیماری‌های

ریوی در حالتی دیگر عبارت است از افزایش بار الاستاز در ریه‌ها و نقصان عملکرد آلفایک آنتی‌تریپسین ناشی از عدم فعال شدن آن توسط اکسیدان‌ها (۱۳). در مطالعه‌ای مشخص گردید که عدم تعادل اکسیدانی / آنتی‌اکسیدانی در جانبازان شیمیایی مواجهه یافته با گاز خردل وجود دارد و استرس اکسیداتیو در این بیماران رخ داده است. استرس اکسیداتیو در یک بافت یا یک ارگان زمانی رخ می‌دهد که تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها با غلبه اکسیدان‌ها به صورت افزایش اکسیدان‌ها یا کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها به هم بخورد (۱۴). استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری‌های ریوی مختلفی دیده شده است. عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها سبب افزایش تعداد اکسیدان‌ها و یا نواقصی در سیستم آنتی‌اکسیدان می‌شوند. اکسیدان‌ها به طور طبیعی در ریه‌ها وجود دارند و برای حیات ضروری هستند. به‌طور هم‌زمان، شبکه گسترده‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های داخل و خارج سلولی وجود دارد. افزایش تعداد رادیکال‌های آزاد به‌عنوان شاخص اکسیدانی و یا کاهش نسبی مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است؛ منجر به عوارض پاتولوژیکی متفاوتی در ریه شوند (۱۴). افزایش تعداد رادیکال‌های آزاد ممکن است؛ در ریه‌ها به‌عنوان نتیجه افزایش تولید داخلی (به‌دلیل التهاب، التهاب ناشی از عوارض دیررس گاز خردل) یا توسط استنشاق رادیکال‌های آزاد (مانند کشیدن سیگار و ذرات ریز) وجود داشته باشد (۱۵). به‌رحال یافته‌های این مطالعه می‌تواند؛ به نقش اکسیدان‌ها در بیماری ریوی ناشی از عوارض دیررس گاز خردل نیز اشاره داشته باشد. زیرا به احتمال زیاد آلفایک آنتی‌تریپسین در این بیماران توسط اکسیدان‌ها غیرفعال شده و موجب تشکیل الاستاز توکسیک شده است. لزوم مطالعات بیشتر برای درک این مکانیسم‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد.

به‌رحال وجود بیماری ریوی آنهم در حدی نسبتاً شدید مسلماً با پروسه التهاب توام است و آلفایک آنتی‌تریپسین یکی از پروتئین‌های فاز حاد است که افزایش مقدار آن در پاسخ به التهاب طبیعی به‌نظر می‌رسد؛ اما در این مطالعه کاهش فعالیت این پروتئین نشان داده شده است که البته این کاهش فعالیت مغایرتی با افزایش مقدار ندارد (۱۳).

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۸۵-۳۴۷) دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی بود و از حمایت مالی مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

## نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که فعالیت آلفایک آنتی‌تریپسین در جانبازان شیمیایی ناشی از مواجهه با گاز خردل کاهش یافته است. انجام مطالعات بیشتر در مایع لاواژ و ارتباط آن با عوامل اکسیداتیو استرس و لزوم درمان مناسب در راستای کاهش عوامل اکسیداتیو استرس ضروری به نظر می‌رسد.

## References

1. Khateri Sh, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D. Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *Journal of occupational and environmental medicine*. 2003; 45(11): 1136-1143.
2. Eden E, Hammel J, Rouhani FN, Brantly ML, Barker AF, Buist AS, et al. Asthma features in severe  $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency: Experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest*. 2003; 123(3):765-771.
3. Fagerhol MK, Cox DW. The Pi polymorphism: genetic, biochemical, and clinical aspects of human alpha 1-antitrypsin. *Adv Hum Genet*. 1981;11:1-62, 371-372.
4. Carrell RW, Jeppsson JO, Laurell CB, Brennan SO, Owen MC, Vaughan L, et al. Structure and variation of human alpha 1-antitrypsin. *Nature*. 1982 Jul 22;298(5872):329-334.
5. Diets AA, Rubinstein HM, Hidges La V. Measurement of alpha 1-antitrypsin in serum, by immunodiffusion and by enzymatic assay. *Clin Chem*. 1974 Mar;20(3):396-399.
6. Wiedemann HP, Stoller JK. Lung disease due to alpha 1-antitrypsin deficiency. *Curr Opin Pulm Med*. 1996 Mar;2(2):155-160.
7. Landau LI. Paediatric basis of adult lung disease. *Paediatr Respir Rev*. 2006;7 Suppl 1:S251-254.
8. Malerba M, Clini E, Cremona G, Radaeli A, Bianchi L, Corda L, et al. Exhaled nitric oxide in patients with PiZZ phenotype-related alpha1-anti-trypsin deficiency. *Respir Med*. 2001 Jun;95(6):520-525.
9. Shapiro SD. The pathogenesis of emphysema: the elastase:antielastase hypothesis 30 years later. *Proc Assoc Am Physicians*. 1995 Oct;107(3):346-352.
10. Tobin MJ, Hutchison DC. An overview of the pulmonary features of alpha 1-antitrypsin deficiency. *Arch Intern Med*. 1982 Jul;142(7):1342-1348.
11. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med*. 2002 Jan 3;346(1):45-53.
12. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, et al. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest*. 2004 May;125(5):1952-1957.
13. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*. 2000 Sep 1; 275(35):27258-27265.
14. Shohrati M, Ghanei M, Shamspour N. Oxidative stress in lung injuries due to sulfur mustard. 44<sup>th</sup> congress of the European societies of toxicology. Amsterdam the northland 7-10 october 2007, C 43.
- 15) Wintroub BU, Kaempfer CE, Schechter NM, Proud D. A human lung mast cell chymotrypsin-like enzyme. Identification and partial characterization. *J Clin Invest*. 1986 Jan;77(1):196-201.