

### بینش پشت استفاده از بیومارکرهای IL-4، IL-2، IFN-G و IL-10 به عنوان نقاط پایانی جانشین برای ابتلا به بیماری‌های پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل

نویسندگان: مرجان زارع<sup>۱</sup>، سقراط فقیه‌زاده<sup>۲\*</sup>، طوبی غضنفری<sup>۳</sup> و شهره جلائی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی - گروه آمار زیستی - دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران.
  - ۲- استاد - گروه آمار زیستی - دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران.
  - ۳- دانشیار - گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد - تهران - ایران.
  - ۴- استادیار - گروه آمار زیستی - دانشکده توانبخشی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران.
- \* نویسنده مسئول:  
E-mail: S.faghihzadeh@shahed.ac.ir

#### چکیده

**مقدمه و هدف:** در این پژوهش هدف آن است که بینش پشت استفاده از بیومارکرهای IL-2، IL-4، IL-10 و IFN-G به عنوان جانشین‌های احتمالی ابتلا به بیماری‌های پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل بررسی شود. اگر بتوان بامشاهده یک اثر معنادار درمان روی جانشین، اثر درمان روی نقطه پایانی بالینی را استنباط کرد، آنگاه این جانشین می‌تواند یک جانشین معتبر باشد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه همگروهی تاریخی شامل ۳۲۸ نفر، که ۲۳۵ نفر مواجهه داشته با گاز خردل از ساکنین سردشت به عنوان گروه مورد و ۹۳ نفر از ساکنین شهر ریت که با گاز خردل مواجهه نداشته به عنوان گروه مورد، سعی شد با استفاده از نسبت خطر، چرایی استفاده از IL-2، IL-4، IL-10 و IFN-G به عنوان جانشین‌هایی برای بیماری‌های پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل بررسی شود.

**یافته‌ها:** روش مطالعه همگروهی تاریخی نشان داد، از IL-2 (در سه محیط کشت سرم، میتوزن، میتوزن نیل) و IL-10 (در چهار محیط کشت سرم، میتوزن، میتوزن نیل و نیل)، IL-4 (در دو محیط کشت میتوزن و میتوزن نیل) می‌توان به عنوان جانشینی برای وجود عارضه پوستی استفاده کرد، چرا که روند بررسی عدم تأثیر مواجهه با گاز خردل روی ابتلا به بیماری‌های پوستی با استفاده از این بیومارکرها به نتیجه مشابه انجام همین بررسی توسط وجود یا عدم وجود بیماری پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل به عنوان نقطه پایانی بالینی واقعی، منجر شد. اما بیومارکرهای IL-4 در محیط کشت سرم و IFN-G (در هر سه محیط کشت سرم، میتوزن و میتوزن-نیل) این ویژگی را نداشتند.

**نتیجه‌گیری:** با مشاهده IL-2 (در سه سطح)، IL-10 (در چهار سطح) و IL-4 (در دو سطح) می‌توان عدم تأثیر مواجهه با گاز خردل را روی ابتلا به بیماری‌های پوستی بررسی کرد، بدون این‌که به مشاهده پیامد اصلی که همان ابتلا به بیماری‌های پوستی است، نیازی باشد.

**واژگان کلیدی:** بیومارکر، نقطه پایانی جانشین، نقطه پایانی بالینی واقعی، گاز خردل، نسبت خطر

دوماهنامه علمی - پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال هفدهم - شماره ۸۸  
شهریور ۱۳۸۹

وصول: ۸۹/۳/۲۵  
آخرین اصلاحات: ۸۹/۶/۲۲  
پذیرش: ۸۹/۷/۲۶

## مقدمه

گاز خردل، از خانواده گازهای سمی، از عوامل جنگ شیمیایی تاووزا با توانایی ایجاد تاول‌های بزرگ روی پوست است و برخلاف اسمش به صورت گاز نیست بلکه یک مایع شیمیایی است که به بخار تبدیل می‌شود. گاز خردل خالص و بدون کلر بوده و در دمای اتاق، مایعی چسبناک است اما هنگامی که در فرم ناخالص، به عنوان یک عامل جنگی به کار رود به طور معمول زرد-قهوه‌ای است و بویی شبیه گوگرد یا سیردارد، گازی ناپایدار، التهاب‌آور و سرطان‌زا است. از این ماده شیمیایی در سال ۱۳۶۶ طی جنگ تحمیلی، علیه ایران استفاده شد. از آنجا که در صورت مواجهه با گاز خردل، علائم آبی ابتلا، به سرعت بروز نمی‌کند و مناطق آلوده شده کاملاً نرمال به نظر می‌رسند، مواجهه‌یافتگان با این گاز، ممکن است بدون اطلاع و آگاهی دوزهای بالایی از این ماده شیمیایی را دریافت کنند. با این حال حدود ۶ تا ۲۴ ساعت بعد از مواجهه، خارش و سوزش شدید در پوست ایجاد شده و به تدریج تاول‌های بزرگی که حاوی مایعی زردرنگ هستند، پدیدار می‌شود که سوختگی شیمیایی نام دارد. مواجهه کم یا متوسط با گاز خردل اغلب کشنده نیست اما فرد مبتلا تا یک دوره طولانی به درمان نیاز داشته و حتی پس از بهبودی سوختگی‌ها، خطر ابتلای روزافزون به سرطان وجود دارد (۶-۱).

مکانیسم‌های ملکولی اثرات درازمدت گاز خردل، شناخته شده نیستند، بنابراین بیومارکرهای شناخته شده و ارزشمند برای تشخیص و ارزیابی پروتکل‌های درمانی در این بیماران در دسترس نیست. به همین دلیل، مشکلات زیادی در تشخیص و پیگیری‌های درمانی به ویژه اثرات مواجهه با گاز خردل وجود دارد. یکی از راه‌هایی که می‌تواند به این افراد کمک کند، یافتن بیومارکرهایی است که بتوانند اثر مواجهه با گاز خردل را پیش‌بینی کنند.

IL-2، IL-4، IL-10 و IFN-G از جمله بیومارکرهای باارزشی هستند که در مطالعات مختلف کارآزمایی‌های بالینی و روش‌های تشخیصی بررسی می‌شوند (۷). پاسخ‌های این بیومارکرها، پاسخ‌های سلولی و هومورال را نشان می‌دهند (۸). این ترکیبات اغلب از سلول‌های ایمنی

ترشح شده و در بیماری‌های مختلف ارزیابی این بیومارکرها اطلاعات باارزشی را درباره پاسخ سیستم ایمنی و وضعیت بیماری فراهم می‌کند. از آنجا که در بررسی اثر یک مداخله یا در بررسی یک سیر درمان و همچنین در مطالعات اپیدمیولوژی، دسترسی به پاسخ‌های انتهایی بالینی در هر مرحله ارزیابی بسیار مشکل است و همچنین کیفی بودن پاسخ‌های به دست آمده، تحلیل و نتیجه‌گیری آن‌ها را محدود می‌کند، لزوم استفاده از بیومارکرها یا اندازه‌های کمی و با قابلیت تکرارپذیری بالا که در آزمایشگاه بتوان آن‌ها را به دست آورد، به جای پاسخ‌هایی همچون چگونگی احساس یا عملکرد بیماران هنگام بررسی اثرات یک مداخله، بسیار باارزش است. در کارآزمایی‌های بالینی یک نقطه پایانی جانشین اندازه اثر یک درمان مشخص است که می‌تواند با نقطه پایانی بالینی همبستگی داشته باشد اما لزوماً یک ارتباط ضمانت‌شده ندارد. سازمان بین‌المللی سلامت (USA) نقطه پایانی جانشین را به عنوان نشانگر حیاتی برای جایگزین کردن یک نقطه پایانی بالینی معرفی می‌کند به ویژه هنگامی که نقطه پایانی بالینی پیامدی نامطلوب مانند مرگ مرتبط با بیماری باشد یا هنگامی که تعداد پیشامدها کم باشد و در نتیجه هدایت یک کارآزمایی برای دستیابی به یک تعداد نقطه پایانی بالینی معنادار از لحاظ آماری ممکن نباشد (۹-۱۱). توجیه مناسب‌تر برای جایگزین شدن یک نشانگر حیاتی به شرایطی قوی‌تر از وجود تنها یک همبستگی نیاز دارد به طوری که اثر مداخله روی نقطه پایانی جانشین بتواند اثر مداخله روی نقطه پایانی بالینی را پیش‌بینی کند (۱۲). نقطه پایانی بالینی، چگونگی احساس، عملکرد یا بقای بیمار را به طور مستقیم اندازه می‌گیرد. هرگونه تغییری که درمان روی نقطه پایانی جانشین سبب شود، تغییر در نقطه پایانی بالینی را منعکس می‌کند. یک مثال معمول از نقطه پایانی جانشین، میزان کلسترول خون است، افزایش سطح کلسترول خون احتمال بیماری قلبی را بالا می‌برد اما ارتباط بین کلسترول و بیماری قلبی خطی نیست. بسیاری از کسانی که میزان کلسترول نرمال دارند به بیماری قلبی مبتلا شده و بسیاری از کسانی که میزان کلسترول بالایی دارند به بیماری قلبی مبتلا نمی‌شوند. مرگ از بیماری قلبی، نقطه پایانی مدنظر است و کلسترول یک نشانگر جانشین است. طی یک

جانشین و همچنین یک آنالیز معتبر روی نقطه پایانی بالینی را بنیان نهند (۱۹) که به این روند، روند معیارسنجی اعتبار جانشین گفته می‌شود.

### مواد و روش کار

داده‌های مطالعه حاضر برگرفته از مطالعه غرضنفری و همکاران است (۲۰) که به صورت همگروهی تاریخی روی ۳۲۸ نفر شامل ۲۳۵ فرد مواجهه‌یافته با گاز خردل در منطقه سردشت به عنوان گروه مورد و ۹۳ نفر از ساکنان شهر ربط که با گاز خردل مواجه نشده و به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شده‌اند، انجام گرفته‌است، تمامی ۲۳۵ نفر در بیمارستان بستری شده بودند. ساکنین شهر ربط که در مجاورت سردشت قرار دارد از نظر قومی، فرهنگی، مذهبی و حتی استرس‌های ناشی از قرار گرفتن در منطقه جنگی و سن همگون با ساکنان سردشت بوده و تنها نقطه تفاوت آن‌ها در مواجهه با گاز خردل در اثر بمباران شیمیایی است. تشخیص متخصص پوست بر وجود یا عدم وجود عارضه پوستی بر اثر مواجهه با گاز خردل براساس دستورالعمل تأیید شده در کمسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران (۲۱،۳) به عنوان نقطه پایانی کلینیکی انتخاب شده‌است. نقطه پایانی جانشین برای جایگزین به جای علائم کلینیکی پوست در اثر مواجهه با گاز خردل بیومارکرهای IL-2 در سه سطح سرم، میتوزن و میتوزن- نیل، IL-4 در سه سطح سرم، میتوزن، میتوزن - نیل، IL-10 در چهار سطح سرم، میتوزن، میتوزن - نیل و IFN-G در سه سطح سرم، میتوزن و میتوزن- نیل اندازه‌گیری شده توسط آزمایشگاه و با استفاده از تکنیک الایزا است.

### روش آماری

ملاک پرنیتیس، استقلال شرطی درمان و نقطه پایانی بالینی را به شرط جانشین در نظر می‌گیرد. این معیار به تنهایی نشان می‌دهد، اثر مشاهده شده درمان روی نقطه پایانی بالینی دلیلی است بر وجود اثر درمان روی نقطه پایانی جانشین اما برخلاف عقیده عموم، پرنیتیس عکس این مطلب را تضمین نمی‌کند، به ویژه این مسئله را که بتوان با مشاهده یک اثر معنادار درمان روی جانشین، اثر درمان روی نقطه پایانی بالینی را استنباط کرد. برای

کارآزمایی بالینی، می‌توان نشان داد، یک داروی مشخص (مانند zocor) بدون این‌که به طور مستقیم از مرگ ناشی از بیماری قلبی پیش‌گیری کند، در کاهش کلسترول خون مؤثر است (۱۳).

در اینجا سعی بر این است که از بین بیومارکرهای IL-2 و IL-4 و IL-10 و IFN-G آنهایی را که ارزش جانشینی دارند، مشخص شوند. اگر تغییر روی جانشین سبب هیچ‌گونه تغییری در وضعیت سلامت فرد نشود باید روی اعتبار جانشین به عنوان یک جایگزین برای نقطه پایانی بالینی تردید داشت و به دنبال جانشینی گشت که هرگونه تغییر در آن موجب تغییر و اصلاح در وضعیت سلامت فرد شود، به عبارتی، قدرت پیش‌گویی‌کنندگی جانشین، می‌تواند روشی برای ارزیابی اعتبار جانشین باشد (۱۴). اما همان‌گونه که سوتر اشاره می‌کند، به‌طور مثال اگر فشار خون بالا فی‌نفسه سبب میرایی شود، پس کاهش فشار خون با هر وسیله‌ای می‌تواند میزان میرایی را تغییر دهد اما اگر در کنار فشار خونی که خودش میرایی را افزایش می‌دهد، مکانیسم‌هایی وجود داشته باشند که فشار خون را بالا ببرند، پس تنها داروهایی که با دخالت روی این مکانیسم‌ها فشار خون را پایین می‌آورند، می‌توانند میزان میرایی را تغییر دهند. همچنین ممکن است، افزایش فشار خون تنها یک نشان و علامت همراه- شده با پروسه آسیب‌شناسی باشد؛ یعنی فشار خون بالا و آسیب‌شناسی مرگ موضوعاتی جداگانه روی یک موضوع باشند که در این حالت، پایین آوردن فشار خون روی میزان میرایی تأثیری نخواهد داشت (۱۵).

مور (۱۶) آسیب‌های احتمالی اتکالوی جانشین غلط را، به‌طور واضح نشان داده‌است که در آن نتایج به دست آمده از یک کارآزمایی تجویز NIH-respond (دارویی برای اصلاح بی‌نظمی ضربان نبض) روی توانایی تنظیم ضربان نامنظم قلب که یک پیشگوی میرایی زودرس است نه تنها بقای بیماران را بالا نبرد بلکه سبب میرایی بالاتری نیز شد. واضح است که جانشین، مبحث مهمی است که نباید نادیده گرفته شود (۱۷). با توجه به اهمیت اعتبار جانشین و کنترل خطای نوع یک (مثبت کاذب) در یک کارآزمایی تصادفی، استفاده از جانشین نباید سبب افزایش خطای نوع یک شود (۱۸). بهترین راه برای تضمین اعتبار جانشین این است که برای مقایسه گروه‌ها، یک آنالیز معتبر روی

سادگی T نقطه پایانی بالینی، Z مواجهه و S جانشین معرفی شده‌اند. این معیار (۱۹) مجموعه‌ای از چهار شرط زیر است که اعتبار یک جانشین را بررسی می‌کند.

معیار اعتبار یک جانشین، شامل بیان زیر است:

اگر  $P_2$  آنگاه  $P_1$ ؛ یعنی اگر درمان روی جانشین اثر داشته باشد، آنگاه روی نقطه پایانی بالینی واقعی اثر دارد. در نتیجه اگر  $P_2$  درست باشد و  $P_1$  غلط، آنگاه معیار اعتبار جانشین صادق نبوده و در نتیجه جانشین معتبر نخواهد بود.

در حالی که پذیرفتن ملاک پرنیس، درستی اعتبار را نشان می‌دهد، بگ ولونگ (۲۲) این رابطه را (اگر ملاک پرنیس آنگاه ملاک اعتبار) زیر سؤال می‌برد، به این طریق که، ملاک پرنیس به یک مغایرت منجر می‌شود؛ یعنی آنالیز جانشینی که ارتباط کمتری با نقطه پایانی بالینی دارد از توان بیشتری برخوردار بوده، بنابراین یک حجم نمونه کمتری را طلب می‌کند تا آنالیز جانشینی که بیشتر با نقطه پایانی بالینی در ارتباط است. در حقیقت، در زمان رویارویی با ابهام، آنالیز تقریبی (آنالیز براساس جانشین)، اهمیت خود را نشان می‌دهد (۲۳) و ملاک پرنیس می‌تواند سبب شود، شخص، آنالیز براساس جانشین را به آنالیز براساس نقطه پایانی بالینی واقعی ترجیح دهد، حتی اگر نقطه پایانی بالینی واقعی در دسترس باشد. به طور حتم، هر چه جانشین آگاهی‌بخش‌تر باشد، آنالیز از توان بیشتری برخوردار خواهد بود (۲۴). با این حال، اگر یک جانشین آگاهی‌بخش‌تر از نقطه پایانی بالینی باشد، آنگاه اطلاعات اضافی را ورای آنچه در دسترس است، ارائه می‌کند و اگر این اطلاعات اضافی منفعت بیمار را منعکس کند، آنگاه جانشین جای نقطه پایانی بالینی را خواهد گرفت. بر خلاف آنچه ما صحت کاذب می‌نامیم، جانشین، اطلاعات بیشتری از آنچه نقطه پایانی بالینی در بردارد، ارائه نمی‌کند. امکان این که شاید انتقاد بگ ولونگ در حقیقت انتقادی نه روی ارتباط ملاک پرنیس که روی بیان این مطلب که این ملاک، اعتبار را نشان می‌دهد، باشد. مغایرت معیار اعتبار و ملاک پرنیس این فهم را القا می‌کند که این ملاک ممکن است آنچه را که به نظر می‌رسد انجام می‌دهد، مانند تضمین درستی معیار اعتبار، انجام ندهد. در اینجا نشان داده خواهد شد که برای بهتر کار کردن این ملاک، معیار

چهارم پرنیس باید عکس شود، یعنی به جای این که نقطه پایانی بالینی واقعی و وضعیت مواجهه به شرط نقطه پایانی جانشین مستقل باشند، وضعیت مواجهه و نقطه پایانی جانشین به شرط نقطه پایانی بالینی واقعی مستقل باشند تا به جای این که با برآورد اثر درمان توسط نقطه پایانی بالینی واقعی، اثر درمان توسط نقطه پایانی جانشین برآورد شود و با استفاده از برآورد اثر درمان توسط نقطه پایانی جانشین بتوان اثر درمان توسط نقطه پایانی بالینی واقعی را برآورد کرد، یعنی در مسیرهایی که به نقطه پایانی بالینی واقعی ختم نمی‌شوند، نقطه پایانی جانشین نیز نباید حضور داشته باشد (۱۹).

نقطه برش براساس توزیع نرمال و حجم نمونه بزرگ و تحت شرط جورسازی کامل و با در نظر گرفتن این که در افراد نرمال یا همان گروه شاهد، مقادیر خیلی پایین و مقادیر خیلی بالا برای این بیومارکرها احتمال ابتلا به بیماری پستی را افزایش می‌دهد، تعیین شده‌است، در افراد گروه مدنظر، ده درصد افراد دارای کمترین مقدار و ده درصد افراد دارای بیشترین مقدار بیومارکر به عنوان افرادی با بیشترین احتمال ابتلا به بیماری پستی (افراد غیرنرمال) معرفی می‌شوند. در نتیجه، بیومارکر نامزد جانشین به یک متغیر دو حالتی تبدیل شده و تمام افراد به دو دسته تقسیم می‌شوند، یک دسته شامل افراد مستعد ابتلا به بیماری پستی یعنی افرادی که با دارا بودن این مقدار از بیومارکر احتمال ابتلا به بیماری پستی در آن‌ها زیاد بوده و افراد دسته دیگر به عنوان افراد نرمال، یعنی افرادی که با دارا بودن این مقدار از بیومارکر احتمال ابتلا به بیماری پستی در آن‌ها کمتر است. در نتیجه، مقادیر بیومارکرهای زیر صدک دهم و بالای صدک نودم (تعیین شده توسط افراد گروه شاهد یا فرد نرمال تحت مطالعه به عنوان نقطه برشی برای نقطه پایانی جانشین که در صورت دارا بودن این مقدار بیشترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی برای فرد وجود دارد ( $S=1$ )) و افراد درون این بازه (به عنوان نقطه برشی برای نقطه ی پایانی جانشین که در صورت دارا بودن این مقدار کمترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی برای فرد وجود دارد ( $S=0$ )) ارائه می‌شوند.

متغیر Z نشان دهنده وضعیت مواجهه ( $Z=1$ ) برای مواجهه با گاز خردل و  $Z=0$  برای عدم مواجهه با گاز

صرفه‌جویی می‌شود و به خصوص هنگامی که نقطه پایانی بالینی یک پیشامد ناخوشایند مانند مرگ در ارتباط با بیماری باشد، انجام آنالیز با بیومارکرها بقای افراد را افزایش داده و از گمشدن افراد در طول دوره پایش و تحمل بیشتر ناراحتی‌های ناشی از دوره مطالعه طولانی، پیش‌گیری می‌کند. پس اگر آنالیز با استفاده از اطلاعات نقطه پایانی بالینی واقعی و آنالیز با استفاده از اطلاعات نقطه پایانی جانشین به یک نتیجه یکسان منجر شود، باید روی ارزش جانشین تکیه کرد و در نتیجه استفاده از نقطه پایانی جانشین منابع را حفظ کرده و اطلاعات کافی را به دست خواهد آمد.

محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS15 انجام شده‌است.

#### یافته‌ها

در آنالیز با تمامی بیومارکرها، احتمال این‌که فرد واقعاً دچار بیماری پستی باشد به شرط دارا بودن مقدار بیومارکر با کمترین احتمال ابتلا به بیماری پستی، صفر است ( $P(T=1 | S=0) = 0$ ). در این آنالیز ۲۳۵ نفر در گروه مواجهه (مورد) و ۹۳ نفر در گروه غیرمواجهه (شاهد) قرار دارند که هر فرد تا زمان رخداد، هم نقطه پایانی بالینی واقعی و هم نقطه پایانی جانشین پایش می‌شود. در حقیقت، اندازه واقعی نمونه‌ها مهم نیست و تنها نرخ‌ها مدنظر قراردارند که در اینجا تنها برای وضوح بیشتر، اندازه نمونه‌ها مشخص می‌شوند.

در گروه مواجهه، هفتاد نفر از ۲۳۵ نفر (۲۹ درصد) و در گروه شاهد دوازده نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه (۱۲ درصد) به بیماری پستی دچار شده‌اند، پس نسبت خطر با استفاده از نقاط پایانی واقعی برابر ۲/۳ است.

$$RR_T = 2.3$$

یعنی احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی، در افراد مواجهه‌یافته با گاز خردل برابر احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی در گروه مواجهه‌نیافته‌است، در نتیجه نشان‌دهنده مضر بودن مواجهه است.

۱. بررسی عدم تأثیر مواجهه با گاز خردل بر اساس بیومارکر IL-2 در سه سطح سرم، میتوزن و میتوزن-نیل: در محیط کشت سرم: در گروه مواجهه، ۵۶ نفر از ۲۳۵ نفر، دارای IL-2 در سطح سرم، دارای S=1

خردل)، T نقطه پایانی بالینی دو حالتی ( $T=1$ ) وجود مشکل پستی و ( $T=0$ ) عدم وجود مشکل پستی) و متغیر دو حالتی S تعریف‌شده به روش بالا که برای هر بیومارکر به‌طور مجزا به‌دست آمده‌است. به‌طور معمول، اگر تعداد افراد با دارا بودن مقادیری برای جانشین با بیشترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی (رخداد S=1) بیشتر از تعداد افرادی باشد که واقعاً دچار بیماری‌های پستی هستند (رخداد  $T=1$ )، آنگاه مشاهده افرادی با دارا بودن مقادیری برای جانشین با کمترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی (رخداد S=0) آگاهی‌بخش‌تر از مشاهده تعداد افرادی با دارا بودن مقادیری برای جانشین با بیشترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی (رخداد S=1) است. برعکس، اگر تعداد افراد با دارا بودن مقادیری برای جانشین با بیشترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی (رخداد S=1) کمتر از تعداد افرادی باشد که واقعاً دچار بیماری‌های پستی هستند (رخداد  $T=1$ )، آنگاه مشاهده افرادی با دارا بودن مقادیری برای جانشین با بیشترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی (رخداد S=1) آگاهی‌بخش‌تر از مشاهده تعداد افرادی با دارا بودن مقادیری برای جانشین با کمترین احتمال ابتلا به بیماری‌های پستی (رخداد S=0) است.

یعنی برای یک نقطه پایانی جانشین نایاب داریم:

$$P(T=1 | S=1) > P(T=0 | S=0)$$

و برای یک پیشامد نقطه پایانی جانشین رایج داریم:

$$P(T=0 | S=0) > P(T=1 | S=1)$$

و این یعنی، برای پیشامد نقطه پایانی جانشین نایاب نرخ طبقه‌بندی نادرست، در زمان برآورد نقطه پایانی بالینی واقعی بر اساس نقطه پایانی جانشین به مقدار نقطه پایانی جانشین بستگی خواهد داشت،

$$P(T=0 | S=1) < P(T=1 | S=0)$$

یعنی: و برای یک نقطه پایانی جانشین رایج داریم:

$$P(T=1 | S=0) < P(T=0 | S=1)$$

معمولاً چون بیومارکرها قبل از مشاهده نقطه پایانی بالینی مشاهده می‌شوند، انجام آزمون با بیومارکرها زودتر به نتیجه رسیده و در نهایت در وقت و هزینه

(۲۳ درصد) و ۱۹ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۲۰ درصد) هستند:

$$RR_{IL-2 \text{ SERUM}} = 1.35$$

در حضور میتوزن: در گروه مواجهه، ۵۲ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-2 در محیط کشت میتوزن، به عنوان S=1 (۲۲ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر در گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۱۹ درصد) هستند:

$$RR_{IL-2 \text{ MITOGEN}} = 1.14$$

در حضور میتوزن - نیل: در گروه مواجهه ۵۴ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-2 در محیط کشت میتوزن - نیل، به - عنوان S=1 (۲۲ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر (۱۹ درصد) در گروه غیرمواجهه دارای S=1 هستند:

$$RR_{IL-2 \text{ MITOGEN-NILL}} = 1.18$$

در هر سه حالت بالا، معیار چهارم پرتیس، به طورعکس برآورد شده است؛ یعنی با برآورد اثر مواجهه با بیومارکر، اثر مواجهه روی نقطه پایانی بالینی برآورد می - شود. مواجهه با گاز خردل احتمال ابتلا به بیماری های پوستی را افزایش می دهد که همان نتیجه به دست آمده از آنالیز براساس مشاهده بیماری پوستی به عنوان نقطه پایانی بالینی واقعی است. پس این بیومارکرها می توانند اثر مواجهه با گاز خردل را پیش بینی کرده و در نتیجه، جانشین خوب ابتلا به بیماری پوستی باشند.

۲. بررسی عدم تأثیر مواجهه با گاز خردل، براساس بیومارکر IL-4 در سه سطح سرم، میتوزن و میتوزن - نیل:

در محیط کشت سرم: در گروه مواجهه ۳۴ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-4 در سطح سرم، دارای S=1 (۱۴ درصد) و ۱۹ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۲۰ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۰/۷۰۸ است:

یعنی با استفاده از IL-4 در سطح سرم، نتیجه ای متناقض با نتیجه به دست آمده با نقطه پایانی بالینی کسب شد. پس این بیومارکر دارای ارزش جانشینی نیست چون معیار چهارم پرتیس به طور عکس برآورده - شده است؛ یعنی با برآورد اثر مواجهه با بیومارکر، نمی - توان اثر مواجهه روی نقطه پایانی بالینی را برآورد کرد.

در حضور میتوزن: در گروه مواجهه، ۸۳ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-4 در حضور میتوزن، دارای S=1 (۳۵ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۱/۸۲ است.

در حضور میتوزن - نیل: در گروه مواجهه ۱۰۶ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-4 در سطح میتوزن - نیل، دارای S=1 (۴۵ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۲/۳۳ است.

در این دو حالت، معیار چهارم پرتیس به طور عکس برآورده شده است؛ یعنی با برآورد اثر مواجهه با این دو بیومارکر، اثر مواجهه روی نقطه پایانی بالینی برآورد می - شود.

۳. بررسی عدم تأثیر مواجهه با گاز خردل براساس بیومارکر IL-10 در چهار سطح سرم، میتوزن، میتوزن - نیل و نیل:

در محیط کشت سرم: در گروه مواجهه ۶۱ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-10 در سطح سرم، دارای S=1 (۲۶ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۱/۳۴ است.

در حضور میتوزن: در گروه مواجهه ۶۲ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-10 در سطح میتوزن دارای S=1 (۲۶ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۱/۳ است.

در حضور میتوزن - نیل: در گروه مواجهه، ۸۴ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IL-10 در محیط کشت میتوزن - نیل به - عنوان S=1 (۳۵ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر در گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر برابر ۱/۸۴ است.

در حضور نیل: در گروه مواجهه ۹۶ نفر از ۲۳۵ نفر در سطح نیل IL-10 دارای S=1 (۴۰ درصد) و ۲۷ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای S=1 (۲۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۱/۴ است. با این بیومارکرها یک نتیجه یکسان مضر بودن مواجهه با گاز

بیومارکر IL-4 در سطح سرم و IFN-G در هر سه سطح سرم، میتوزن و میتوزن - نیل جانشین مناسبی برای بیماری پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل نیستند. از بین تمامی این بیومارکرها، آنالیز براساس IL-4 در سطح میتوزن - نیل، می‌توانست به بهترین صورت آنالیز فرض صفر عدم تأثیر مواجهه بر بیماری پوستی را برآورد کند چرا که نسبت خطر براساس این بیومارکر ۲/۳۳ است که نزدیک‌ترین عدد در بین نسبت‌های خطر دیگر به نسبت خطر براساس نقطه پایانی بالینی واقعی بود.

در افراد نرمال، تعداد ناکافی کسانی که به بیماری پوستی مبتلا بودند، به تعیین نقطه برش بر اساس استاندارد توزیع نرمال منجر شد ( $p > 0.05$ ). به کمک معیارهای پرتیس، سهم اثر مواجهه توصیف‌شده با هر یک از جانشین‌ها به‌دست می‌آید که به جانشین‌های آماری موسوم هستند (۲۶-۳۰) وجود جانشین‌های آماری برای تأثیر مواجهه روی بیماری لازم بوده اما کافی نیست. بیومارکری که برای تأثیر مواجهه روی بیماری، هم لازم و هم کافی باشند، به جانشین‌های اصلی معروفند. این جانشین‌ها براساس طبقه-بندی اصلی و اثرات علی (اثراتی که منحصر به درمان هستند و نه هیچ صفت یا صفاتی از بیمار یا شرایط بیماری) بررسی می‌شوند (۳۱-۳۴). همچنین مواجهه با مکانیسم‌های متفاوتی روی ابتلا به بیماری‌های پوستی اثر می‌کند، بهتر است اثر جانیشینی همزمان چندین بیومارکر را در نظر گرفت (۳۴ و ۳۵).

خردل برای ابتلا به بیماری‌های پوستی به‌دست‌آمد. همچنین معیار چهارم پرتیس به‌طورعکس برآورده‌شده است یعنی با برآورد اثر مواجهه با بیومارکر، اثر مواجهه روی نقطه پایانی بالینی برآورد می‌شود.

۴. بررسی عدم تأثیر مواجهه با گاز خردل براساس بیومارکر IFN-G در سه سطح سرم، میتوزن و میتوزن-نیل:

در محیط کشت سرم: در گروه مواجهه ۴۴ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IFN-G در سطح سرم، دارای  $S=1$  (۱۸ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای  $S=1$  (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۰/۹۶ است.

در حضور میتوزن: در گروه مواجهه، ۳۴ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IFN-G در سطح میتوزن، دارای  $S=1$  (۱۴ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای  $S=1$  (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۰/۷۴ است.

در حضور میتوزن - نیل: در گروه مواجهه، ۳۷ نفر از ۲۳۵ نفر دارای IFN-G در سطح میتوزن-نیل، دارای  $S=1$  (۱۵ درصد) و ۱۸ نفر از ۹۳ نفر گروه غیرمواجهه دارای  $S=1$  (۱۹ درصد) هستند. نسبت خطر براساس این بیومارکر ۰/۸۱ است.

یعنی با استفاده از IFN-G در هر چهار سطح، یک نتیجه متناقض با نتیجه به‌دست‌آمده با نقطه پایانی بالینی کسب‌شد پس این بیومارکرها دارای ارزش جانیشینی نیستند، یعنی معیار چهارم پرتیس به‌طورعکس برآورده نشده است و با برآورد اثر مواجهه با این بیومارکرها، نمی‌توان اثر مواجهه روی نقطه پایانی بالینی را برآورد کرد.

## بحث

از بین بیومارکرها ذکر شده در بالا، هر کدام در چند محیط کشت مختلف، آنالیز براساس بیومارکرها IL-2 در سه محیط، L-10 در چهار محیط کشت، IL-4، به نتیجه یکسان آنالیز براساس وجود یا عدم وجود بیماری پوستی رسیدند که در نتیجه می‌توانند یک جانشین برای بیماری پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل باشند. اما

منابع

- 1- Evison D, Hinsley D, Rice P: Chemical Weapons. *BMJ* 2-9-2002; 324: 332-335.
- 2- Bullman T, Kang H: A fifty year mortality follow-up study of veterans exposed to low level chemical warfare agent, mustard Gas. *Ann Epidemiol* 2000; 10: 333-338.
- 3- Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D: Incidence of lung, eye and skin lesion as late complications in 34000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. *J Occp Environ Med* 2003;45:1136-1143.
- 4- Ghanei M, Aslani J, Khateri S, Hamadanizadeh K: Public health status of the civil population of sardasht 15 years of Burns & Surgical Wound Care 2003; 2: 7-18.
- 5- Momeni AZ, Enshaeh S, Meghdadi M, Aminidjavaheri M: Skin manifestation of mustard gas. A clinical study of 535 patients exposed to mustard gas. *Arch Dermatol* 1992;128:775-780.
- 6- Emadi SN, Hosseini-khalili A, Soroush MR, Davoodi SM, Aghamiri SS. Mustard gas scarring with specific pigmentary, trophic and vascular characteristics (case report, 16-year post-exposure). *Ecotoxicology and Environmental Safety* In press, Corrected Proof :-792.
- 7- Temple RJ. Are surrogate markers adequate to assess cardiovascular disease drug? *Journal of the American Medical Association* 1999;282:790-795.
- 8- Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2001;69:89-95. DOI:10.1067/mcp.2001.113989.
- 9- JSN Matthews. An introduction to randomized controlled clinical trial 2001;30:908-909.
- 10- Jay N. Cohn, MD. Introduction to Surrogate Markers *Circulation* 2004;109:IV-20 – IV-21.
- 11- Alexander Goho. An Imperfect Subtitle *CR Magazine*. Spring 2009.
- 12- Fleming T, David D. Surrogate End Points in Clinical Trials: Are We Being Misled? *Ann Intern Med*. 1996 Oct 1;125(7):605-13
- 13- Temple RJ. A regulatory authority's opinion about surrogate endpoints. *Clinical Measurement in Drug Evaluation*. Edited by Nimmo WS, Tucker GT. New York: Wiley; 1995.
- 14- Lagakos SW, Hot DF. Surrogate markers in AIDS: Where are we? Where are we going? *Annals of Internal Medicine* 1992;116(7):599-601
- 15- Sutter MC. Assigning causation in disease: beyond Koch's postulates. *Perspectives in Biology and Medicine* 1996;39(4):581-592.
- 16- Moor T. *Deadly Medicine*. Harper-Collins: New York, 1995.
- 17- Vourlekis JS, Szabo E. Predicting success in cancer prevention trials. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95(4):178-179.
- 18- Berger VW. Pros and cons of permutation tests. *Statistics in Medicine* 2000;19:1319-1328.
- 19- Prentice RL. Surrogate endpoints in clinical trials: definition and operational criteria. *Statistics in Medicine* 1989;8:431-440
- 20- Ghazanfari T, Faghihzadeh S, Aragizadeh H. Historical Cohort Study of Chemical Warfare Victims, 20 Yea after Sulfur Mustard Exposure (Sardasht- Iran Study): Design and Methods *Arch Iranian Med* 2009; 12 (1): 5 – 14.
- 21- Balali-Mood M, Hafezi M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulfur mustard poisoning. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:297-315..
- 22- Begg CB, Leung DHY. On the use of surrogate endpoints in randomized trials. *The Journal of the Royal Statistical Society Series A* 2000;163:15-24.
- 23- Berger VW, Lunneborg C, Ernst MD, Levine JG. Parametric analysis in randomized clinical trials. *Journal of Modern Applied Statistical Methods (JMASM)* 2002;1(1):74-82.
- 24- Berger VW. Improving the information content of categorical clinical trial endpoints. *Controlled clinical trials* 2002;23:502-514.
- 25- Vance W. Berger. Does the Prentice criteria validate surrogate endpoints? *Med*. 2004; 23:1571-1578.
- 26- Alonso A, Molenberg G, Geys H, Buyse M, Vangeneugden T. Unifying approach for surrogate marker validation based on Prentice criteria. *STATISTIC IN MEDICINE* 2006; 25:205-221.
- 27- Li Z, Meredith MP, Hosseini MS. A method to assess the proportion of treatment effect explained by a surrogate endpoint *STATISTIC IN MEDICINE* 2001; 20:3175-3188.
- 28- Chen H, Geng Z, Jia J. Criteria for surrogate endpoints. *J. R. Statist. Soc. B* 2007; 69: 919- 932.
- 29- Chen C, Wang h, Snapinn SM. Proportion of treatment effect (PTE) explained by a surrogate marker. *STATISTIC IN MEDICINE* 2003; 22:3449-3459.
- 30- Weir CJ, Walley RJ. Statistical evaluation of biomarkers as surrogate endpoints: a literature review. *STATISTIC IN MEDICINE* 2006; 25:183203.
- 31- Joffe MM, Green T. Related Casual Framework for Surrogate Outcomes. *Biomarkers* 2009; 65: 530-538.
- 32- Frangakis CE, Rubin DB. Principal Stratification in Casual Inference. *Biometrics* 2002; 58: 21-29.
- 33- Gilbert PB, Hudgens MG. Evaluating Principal Surrogate Endpoints. *Biometrics* 2008; 64: 1146-1154.
- 34- Xu J. The Evaluating of Multiple Surrogate Endpoints. *Biometrics* 2001; 57: 81-87.
- 35- Qu Y, Case M. Quantifying the indirect treatment effect via surrogate markers. *STATISTIC IN MEDICINE* 2006; 25:223-231.