

# دانشور

## پزشکی

### بررسی اعتبار جانشینی سایتوکاین‌های Th1 و Th2 در بیماران مبتلا به عارضه پوستی ناشی از اثرهای درازمدت گاز خردل

نویسندگان: شهره جلائی<sup>۱</sup>، دکتر سقراط فقیه‌زاده<sup>۲\*</sup>، دکتر طویی غضنفری<sup>۳</sup>، فرزاد اسکندری<sup>۴</sup>، رویا یارایی<sup>۵</sup>، دکتر اطهر معین<sup>۶</sup>، سیدمسعود داود<sup>۷</sup>، محمدرضا سروش<sup>۸</sup>، عباس فروتن<sup>۹</sup> و محمد مهدی نقی‌زاده<sup>۹</sup>

۱. دانشجوی دکتری آمار زیستی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲. استاد آمار زیستی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۴. دانشیار آمار دانشکده اقتصاد دانشگاه علامه طباطبائی
۵. دانشیار پوست دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۶. دانشیار پوست دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله
۷. محقق پژوهشکده مهندسی و علوم پزشکی جانبازان
۸. استاد فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۹. پژوهشگر مرکز تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

E-mail: s.faghihzadeh@shahed.ac.ir

نویسنده مسئول:

#### چکیده

مقدمه و هدف: این مطالعه سعی بر آن دارد تا ارزش جانشینی پاسخ‌های Th1 و Th2 در ارزیابی عوارض درازمدت پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل را بر اساس دستورالعمل کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران بررسی کند.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر بخشی از مطالعه غضنفری و همکاران (۱۳۸۷) است که به صورت همگروهی تاریخی بر روی ۵۰۰ نفر انجام گرفته است. در این مطالعه ۳۷۲ نفر از مصدومین شیمیایی سردشت و ۱۲۸ نفر از شهر ربط به‌عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

نتایج: نتایج نشان می‌دهند که هر ۴ فاکتور IL2 Mitogen-Nill, IFN-g Mitogen-Nill, IFN-g Mitogen-Nill و IL2 Mitogen دارای اعتبار در سطح آزمایشی بالا ( $PE > 80\%$ ) هستند. بررسی مقدار اعتبار در سطح فردی نشان داد هر چند از بین سایتوکاین‌های Th1 و Th2، سایتوکاین‌های Th1 در حضور میتوزن دارای قابلیت جانشینی مناسب‌تری برای عارضه‌های پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل هستند، ولی اعتبار در سطح فردی در تمام این فاکتورها بسیار پایین است و هیچ‌یک نمی‌تواند جانشین مناسبی در سطح فردی برای وجود یا عدم وجود عارضه پوستی براساس دستورالعمل تأییدشده در کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران تحت مواجهه با گاز شیمیایی خردل باشد.

نتیجه‌گیری: مقدار بالای اعتبار آزمایشی در ۴ فاکتور بالا می‌تواند در سطح جامعه نشانگر آن باشد که نسبت بزرگی از آثار گاز خردل بر نقطه انتهایی کلینیکی روی این نقاط انتهایی جانشین دیده می‌شود. این رابطه از نظر محققین پزشکی بسیار مهم است؛ زیرا عواملی که بتوانند سطح متوسط آن‌ها را تغییر دهند، می‌توانند بر متوسط احتمال بروز عوارض پوستی نیز تأثیر گذار باشند. عدم وجود قابلیت جانشینی این فاکتورها در سطح فردی و اندازه اعتبار پایین آن‌ها برای سنجش ضایعات پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل بر اساس طبقه‌بندی این مشکلات با استفاده از روش تأییدشده توسط کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران، برای پزشکان بسیار ارزشمند است؛ ولی باید توجه داشت که برای تشخیص، تشخیص افتراقی، اندازه شدت و پیشرفت بیماری و پاسخ به درمان در بیماران، ارزیابی توانایی یک درمان جدید، و نیز پیش‌آگاهی این بررسی باید بر اساس نوع بیماری به صورت جداگانه نیز انجام شود.

واژه‌های کلیدی: نقاط پایانی جانشین، اعتبار، مصدومین شیمیایی، گاز خردل، عوارض بالینی درازمدت، سایتوکاین‌ها، Th1، Th2، مشکلات پوستی

دوماهنامه علمی - پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال شانزدهم - شماره ۷۹  
اسفند ۱۳۸۷

وصول: ۸۷/۴/۲۹

ارسال اصلاحات: ۸۷/۶/۱۲

دریافت اصلاحات: ۸۷/۶/۱۸

پذیرش: ۸۷/۷/۱۵

## مقدمه

شهر سردشت در طی جنگ عراق علیه ایران در تیر ماه ۱۳۶۶ مورد حمله شیمیایی نیروهای عراق قرار گرفت. هنوز بعد از گذشت حدود ۲۰ سال، مصدومین شیمیایی این حمله از عوارض بالینی درازمدت گاز خردل رنج می‌برند. گاز خردل (سولفور موستارد)، یک عامل الکیله‌کننده است که دارای آثار کوتاه‌مدت و درازمدت بر ریه، پوست، چشم و سیستم عصبی است [۱، ۲، ۳ و ۴]. این گاز پس از مواجهه، در پوست جذب و آثار کوتاه‌مدت و درازمدتی بر جای می‌گذارد. آثار کوتاه‌مدت خردل در پوست شامل سوختگی، تاول، راش‌های جلدی و سوزش است [۵]. در درازمدت این عوارض به صورت خارش، اگزما، خشکی، تغییر رنگ به صورت‌هایپیر و هایپوپیگمانتاسیون و درماتیت سبوره است [۳، ۴ و ۶].

پاتوفیزیولوژی و سازوکارهای مولکولی از آثار درازمدت گاز خردل شناخته نشده است و در حال حاضر، بیومارکرهای شناخته شده و ارزشمند برای تشخیص و ارزیابی پروتوکل‌های درمانی در این بیماران، در دسترس نیست. به همین دلیل مشکلات زیادی در تشخیص و پیگیری‌های درمانی به‌ویژه ارزیابی تأثیرات مواجهه با گاز خردل وجود دارد. یکی از راه‌هایی که می‌تواند به این افراد کمک کند یافتن بیومارکرهایی است که بتوانند در تشخیص و یا پیگیری درمانی مفید واقع شوند.

از آن‌جا که در بررسی اثر یک مداخله یا در بررسی یک سیر درمان و همچنین در مطالعات اپیدمیولوژیک، دسترسی به پاسخ‌های انتهایی کلینیکی در هر مرحله از ارزیابی بسیار مشکل است و همچنین کیفی بودن پاسخ‌های به دست آمده، تحلیل و نتیجه‌گیری از آن‌ها را محدود می‌سازد، لزوم استفاده از مارکرهای حیاتی، با اندازه‌های کمی و با قابلیت تکرارپذیری بالا که قابل حصول توسط آزمایشگاه باشند به جای پاسخ‌هایی مثل چگونگی احساس یا عملکرد بیماران (True endpoint) در موقع بررسی آثار یک مداخله، بسیار با ارزش است. این مارکرها طبق تعریف انجمن غذا و داروی آمریکا (United States Food and Drug Administration (FDA) [۷ و ۸] و گروه‌های کاری برای تعریف بیومارکرها (Biomarkers Definitions Working Group) (BDWG) [۹]، نقاط پایانی جانیشین (Surrogates) گفته می‌شوند.

نقاط پایانی جانیشین اغلب آسان‌تر و ارزان‌تر اندازه‌گیری می‌شوند و نتایج حاصل از آن‌ها سریع‌تر قابل مشاهده‌اند و استفاده از آن‌ها می‌تواند در افزایش وقت و کاهش زمان و بودجه در کارآزمایی‌های بالینی بسیار مؤثر باشد [۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳]، مشروط بر این‌که تغییرات در این خروجی‌ها بر اثر مداخله، مشابه تغییرات حالات کلینیکی بر اثر مداخله باشد.

در مطالعه حاضر که برای اولین بار به منظور جستجوی بیومارکرهای ارزشمند در افراد آلوده به خردل انجام می‌شود، ارزش جانیشینی سایتوکاین‌های Th1 و Th2 برای جانیشینی مشکلات پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل مورد بررسی قرار گرفته است. سایتوکاین‌ها از جمله بیومارکرهای با ارزشی هستند که در مطالعات مختلف کارآزمایی‌های بالینی و روش‌های تشخیصی مورد بررسی قرار می‌گیرند [۱۴]. پاسخ‌های Th1 و Th2 از جمله الگوهای مهم سایتوکاینی هستند که وضعیت پاسخ‌های سلولی و هومورال را نشان می‌دهند [۱۵]. این ترکیبات عمدتاً از سلول‌های سیستم ایمنی ترشح می‌شوند. در بیماری‌های مختلف، ارزیابی این سایتوکاین‌ها اطلاعات با ارزشی در مورد پاسخ سیستم ایمنی و وضعیت بیماری فراهم می‌کند. در مطالعات متعدد، ارزش این سایتوکاین‌ها و ارتباطشان با ضایعات پوستی مورد بررسی قرار گرفته است [۱۶، ۱۷ و ۱۸]؛ ولی از آن‌جا که این بیومارکرها در وضعیت‌های کلینیکی مختلف، الگوهای متفاوتی را از خود نشان می‌دهند برای استفاده کاربردی از آن‌ها باید ارزش جانیشینی آن‌ها تحت مداخلات مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد. تاکنون مطالعه دقیق علمی بر روی چگونگی تأثیرات گاز خردل بر فاکتورهای ایمنی و سایتوکاین‌ها و در نتیجه بر روی حالات کلینیکی ایجاد شده از آن صورت نگرفته است.

از آن‌جا که اعتبار یک نقطه پایانی جانیشین در درستی تفسیری است که هنگام استفاده از آن به جای علائم کلینیکی در بررسی اندازه اثر مداخله از آن‌ها می‌شود [۱۹]، واضح است که اعتبار و میزان مرغوبیت جانیشین‌هایی که قرار است به رسمیت شناخته شوند باید به دقت مورد ارزیابی قرار گیرد [۲۰].

روش‌های آماری متفاوتی برای بررسی اعتبار مارکرهای حیاتی جانیشین از سال ۱۹۸۹ تاکنون ارائه گردیده که

بنابراین، مطالعه حاضر سعی دارد تا ارزش جانیشینی پاسخ‌های Th1 و Th2 در تشخیص عوارض درازمدت پوستی ناشی از مواجهه با گاز خردل را ارزیابی کند.

### روش کار

پژوهش حاضر بخشی از مطالعه غضنفری و همکاران او [۲۶] است که به صورت همگروهی تاریخی بر روی ۵۰۰ نفر شامل ۳۷۲ نفر از مصدومین شیمیایی در منطقه سردشت و ۱۲۸ نفر از ساکنان شهر ربط به‌عنوان گروه کنترل، انجام پذیرفته است. از ۳۲۷ نفر مصدوم شیمیایی، ۱۶۹ نفر پس از مواجهه در بیمارستان بستری و ۲۰۳ نفر به صورت سرپایی درمان شده بودند که در این جا به‌عنوان گروه غیربستری شناخته می‌شوند. ساکنین شهر ربط که در مجاورت سردشت قرار دارد از نظر قومی، فرهنگی، مذهبی و حتی وجود استرس‌های ناشی از قرار گرفتن در منطقه جنگی، همگون با ساکنان سردشت هستند و تنها نقطه افتراق این دو جمعیت، بمباران شیمیایی سردشت است. گروه کنترل در مطالعه فوق از نظر سن نیز هماهنگ با گروه مواجهه انتخاب شده بودند.

در مطالعه حاضر به منظور پیدا کردن جانیشین‌های احتمالی و محاسبه میزان اعتبار آن‌ها ۱۶ فاکتور ایمنی برای استفاده به منظور جایگزین شدن به جای علائم کلینیکی پوست در اثر مواجهه شیمیایی با گاز خردل مورد بررسی قرار گرفته است.

تشخیص پزشکی متخصص پوست بر وجود یا عدم وجود عارضه پوستی بر اثر مواجهه با گاز شیمیایی خردل بر اساس دستورالعمل تأیید شده در کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران [۲۷ و ۳] به‌عنوان نقطه پایانی کلینیکی انتخاب شد. نقاط پایانی جانیشین برای جایگزینی به جای علائم کلینیکی پوست در اثر مداخله شیمیایی با گاز خردل، فاکتورهای سایتوکاینی Th1، Th2 شامل ۴ فاکتور IL2، IL4، IL10 و IFN $\gamma$  هستند که هر یک در ۴ محیط سرم و کشت بدون تحریک (Nil)، کشت پس از تحریک (Mitogen)، و اثر تحریک با کسر پاسخ پایه (Mitogen-Nil) (ایندکس تحریکی) توسط آزمایشگاه با استفاده از تکنیک الیزا اندازه‌گیری شده‌اند. برای سنجش الیزا از کیت‌های شرکت R&D برای تک تک سایتوکاين‌های مورد نظر استفاده گردیده است.

هریک در موارد خاص کاربرد داشته است [۲۱]. در سال (۱۹۸۹) پرنایس (Prentice) در یک مقاله پایه برای اولین بار یک تعریف رسمی از جانیشین‌ها و ملاک‌هایی برای بررسی اعتبار جانیشین‌ها بر مبنای آزمون فرض ارائه کرد [۲۲]. به دنبال او، فریدمن (Freedman) (۱۹۹۲) با معرفی ملاک جدید نسبت آثار PE (Proportion effect) سعی کرد اندازه اعتبار جانیشین‌ها را کمی کند و عددی برای اندازه اعتبار جانیشین‌ها معرفی کند [۲۳]. بیز (Buyse) و همکارانش (۱۹۹۸) نشان دادند که PE یک اندازه ترکیبی است و باید اعتبار در دو سطح فردی و آزمایشی به صورت جداگانه بررسی شود [۲۴]. پس از آن، مطالعات گسترده‌ای در سطح اعتبار فردی و آزمایشی به صورت موازی در موارد مختلف انجام پذیرفته و برای هر یک از این موارد، فرمول‌های متفاوتی به منظور کمی کردن میزان اعتبار جانیشین‌ها در هر یک از دو سطح فردی و آزمایشی ارائه شده است. نهایتاً آلونس (Alonse) و همکاران (۲۰۰۶)، ملاک جدید فاکتور کاهش درست نمایی (LRF) (Likelihood Reduction Factor) را در سطح فردی معرفی کردند که می‌تواند با استفاده از نرم‌افزارهای استاندارد آماری به صورت واحد برای تمام حالات مختلف متغیر پاسخ به کار گرفته شود [۲۵]. در این مطالعه ما با استفاده از این روش اعتبار فردی، بیومارکرهای جانیشین را بررسی می‌کنیم.

سؤال اساسی در این مطالعه این است که آیا می‌توان از بین پاسخ‌های سایتوکاینی Th1 و Th2 جانیشینی مناسب برای بررسی عوارض کلینیکی ایجاد شده بر روی پوست افراد آلوده شده به گاز خردل یافت؟ و این‌که آیا واقعاً نتیجه آزمایشگاهی اندازه‌گیری سطوح مختلف Th1 و Th2 می‌تواند نشان‌دهنده آثار ایجاد شده به وسیله گاز خردل بر علائم کلینیکی پوست افراد مبتلا باشد؟ در واقع، چه تغییری در الگوهای سایتوکاینی Th1 و Th2 می‌تواند به صورت مناسب جانیشین عوارض کلینیکی بر روی پوست افراد مبتلا به گاز خردل باشد؟

چنانچه یک یا چند علامت بیولوژیک به‌عنوان جانیشین‌های مناسب برای یک مداخله ثبت شوند، آنگاه می‌توان از آن‌ها به منظور تشخیص، تشخیص افتراقی، اندازه‌شدت و پیشرفت بیماری و پاسخ به درمان در بیماران، ارزیابی توانایی یک درمان جدید، و پیش‌آگاهی استفاده کرد.

## بررسی آماری

به دلیل گسسته بودن نقطه پایانی کلینیکی اندازه اعتبار در سطح فردی برای هر یک از فاکتورهای ایمنی جانشین از روش (LRF) ارائه شده توسط آلونس (Alonso) و همکارانش (۲۰۰۶) استفاده گردیده است (ضمیمه). در این روش، اندازه LRF برابر با مقدار همبستگی بین دو نقطه پایانی جانشین و کلینیکی به ازای هر فرد بعد از تعدیل آثار مواجهه با استفاده از فرمول  $LRF = 1 - \exp(-G^2/n)$  که  $G^2$  برابر با آماره نسبت درست نمایی (در مقایسه دو مدل ۱ و ۲ در ضمیمه) و  $n$  برابر با حجم کل افراد مورد بررسی است محاسبه گردید.

به منظور بررسی اعتبار در سطح آزمایشی از روش ارائه شده توسط ملنبرگ (Molenberghs) و همکارانش (۲۰۰۱) استفاده گردید. این روش، مناسب زمانی است که نقطه پایانی کلینیکی گسسته و نقطه پایانی جانشین پیوسته باشد. به وسیله فرمول‌های پیشنهادی  $\alpha$  و  $\beta$  حاصل شده از معادلات ۱ و ۲ (ضمیمه) تعدیل و استاندارد گردیده، برای هر یک از متغیرهای ایمنی جانشین به تفکیک محاسبه شد و نهایتاً مقدار اعتبار آزمایشی (PE) که عبارت است از  $PE = \beta/\alpha$  با توجه به  $\alpha$  و  $\beta$  تعدیل شده، برای هر کدام از جانشین‌ها محاسبه و آورده شده است. محاسبات آماری در محیط نرم‌افزار  $R_{2.6.1}$  انجام شد.

## نتایج

یافته‌های بالینی بر روی افراد شیمیایی شده نشان می‌دهد که ۴۵/۲ درصد از افراد بستری شده و ۱۴/۹ درصد از افراد مواجه یافته که بستری نشده بودند، بر اساس پروتکل تشخیصی، تأیید شده در کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران که در درجه‌بندی ضایعات پوستی جانبازان شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، به عوارض پوستی مبتلا شده‌اند. این در صورتی است که ۱۱/۶ درصد از افراد گروه کنترل نیز بر اساس این پروتکل دچار مشکلات پوستی مشابه بودند. میانه فاکتورهای سایتوکاینی در گروه کنترل و مواجهه یافته غیربستری و مواجهه یافتگانی که در زمان مواجهه به دلیل شدت مواجهه در بیمارستان بستری شده بودند، در جدول ۱ آورده شده است.

در جدول ۱ می‌توان آثار درازمدت مواجهه شدید و خفیف با گاز خردل را روی میانه فاکتورهای سایتوکاینی Th1 و Th2 دید.

همچنین میانگین فاکتورهای سایتوکاینی Th1 و Th2 بین دو گروه غیرمواجهه و مواجهه بیمارستانی مقایسه شده است. مقدار فاکتور IL2 در حضور میتوزن بین این دو گروه دارای تفاوت معنادار ( $p=0/027$ ) و فاکتور IFN-g در حضور میتوزن بین این دو گروه دارای تفاوت معنادار ( $p=0/032$ ) است.

برای بررسی اعتبار در سطح فردی برای هر یک از ۱۶ متغیر ایمنی مورد بررسی به طور جداگانه فرایند اعتبارسنجی را انجام دادیم، ولی تنها ۴ فاکتور از ۱۶ فاکتور مورد بررسی تحت مداخله شیمیایی تغییر معنادار پیدا می‌کرد؛ بدین معنا که متوسط مقدار بقیه فاکتورهای ایمنی در افراد تحت مداخله با افراد سالم تفاوت معناداری نداشت. در نتیجه، آن عامل‌ها اصولاً نمی‌توانستند فرایند اعتبارسنجی را ادامه دهند. نتایج حاصل برای کلیه ضرایب و میزان P-value برای هر فاکتور به تفکیک فاکتورهای مورد بررسی و نتایج محاسبات اعتبارسنجی در جدول ۲ آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود اعتبار در سطح فردی در تمام این فاکتورها بسیار پایین است و هیچ‌یک از فاکتورها نمی‌تواند جانیشینی مناسب در سطح فردی برای وجود یا عدم وجود عارضه پوستی بر اساس دستورالعمل تأیید شده در کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران تحت مواجهه با گاز شیمیایی خردل باشد؛ ولی مقادیر نهایی اعتبار آزمایشی (PE) در جدول ۲ نشان می‌دهد که هر ۴ فاکتور مذکور دارای اعتبار در سطح آزمایشی بسیار بالا است. مقادیر آن‌ها صرف‌نظر از علامت منفی ( $PE > 0.80$ ) است. علامت منفی تنها بدین معنا است که کاهش سطح این بیومارکرها در افراد آلوده شده به گاز خردل با افزایش احتمال بروز عارضه پوستی در این افراد همراه است.

## بحث

پس از گذشت ۲۰ سال از آخرین بمباران شیمیایی، مصدومین شیمیایی گاز خردل، همچنان از عوارض درازمدت این گاز سمی رنج می‌برند. این عوارض شامل

جدول ۱. میانه فاکتورهای سایتوکاینی Th1, Th2 در افراد مورد بررسی در واحد pg/ml در کل افراد مورد بررسی (n= 500)

گروه بررسی			محیط مورد بررسی	فاکتور ایمنی
مواجهه (n=372)		غیر مواجهه (n=128)		
بیمارستانی (n=169)	غیربیمارستانی (n=203)			
5/56	5/45	4/46	سرم	IL-2
0/000	0/000	0/000	بدون تحریک	
631/16	731/45	1052/67	میتوزن	
591/96	695/30	1017/28	ایندکس تحریکی	IL-4
11/64	11/37	10/50	سرم	
19/05	17/37	17/37	بدون تحریک	
72/08	67/47	118/12	میتوزن	IL-10
50/41	49/10	78/64	ایندکس تحریکی	
17/28	16/86	16/63	سرم	
65/02	60/86	26/36	بدون تحریک	IFN-g
196/50	183/30	172/70	میتوزن	
98/92	93/92	98/49	ایندکس تحریکی	
8/53	8/08	8/14	سرم	IFN-g
21/15	11/81	15/41	بدون تحریک	
4679/19	5618/48	5204/98	میتوزن	
4489/95	5486/84	4920/62	ایندکس تحریکی	

جدول ۲. مقدار P-Value, اندازه اعتبار در سطح فردی و آزمایشی در فاکتورهای راه یافته به ارزیابی جانشینی

نام فاکتور	تفاوت میانگین گروه غیرمواجهه و گروه بیمارستانی (P-Value)	اعتبار فردی (LRF) (P-Value)	اعتبار آزمایشی (PE)
IL2 در حضور میتوزن	0/73 (0/027)	2/08 (0/073)	-/81/14
IL2 با ایندکس تحریکی	0/61 (0/034)	1/81 (0/075)	-/83/98
IFN-g در حضور میتوزن	1/43 (0/032)	1/45 (0/041)	-/82/22
IFN-g با ایندکس تحریکی	1/41 (0/038)	1/26 (0/056)	-/84/68

یافتن جانشین مناسب برای عوارض پوستی گاز خردل و در نتیجه، روش تشخیصی مناسبی برای عوارض پوستی ناشی از این گاز خطرناک معرفی نشده است. امروزه استفاده از شاخص‌های مولکولی به‌عنوان بیومارکرهای مفید در تشخیص علائم بالینی که بتوانند جانشین مناسبی برای

عوارض موضعی در ریه، چشم، پوست و عوارض سیستماتیک در خون، مغز استخوان و سیستم ایمنی و عصبی هستند.

علی‌رغم کوشش‌های مداوم متخصصان بالینی برای تشخیص و درمان این بیماران تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر

می‌دهد که هر ۴ فاکتور مذکور دارای اعتبار در سطح آزمایشی بسیار بالا ( $PE > 0.80$ ) و با علامت منفی هستند. علامت منفی بدین معنا است که کاهش سطح این بیومارکرها در افراد آلوده شده به گاز خردل با افزایش احتمال بروز عارضه پوستی در آنان همراه است. مقدار بالای اعتبار آزمایشی در این فاکتورها قطعاً می‌تواند در سطح جامعه نشانگر آن باشد که نسبت بزرگی از آثار گاز خردل روی نقطه انتهایی کلینیکی بر روی نقطه انتهایی جانشین دیده می‌شود. این رابطه از نظر محققین پزشکی بسیار مهم است؛ زیرا عواملی که بتوانند سطح متوسط آن‌ها را تغییر دهند می‌توانند بر متوسط احتمال بروز عوارض پوستی نیز تأثیرگذار باشند.

از آن‌جا که اعتبار در سطح فردی و آزمایشی به‌طور جداگانه بررسی و تفسیر می‌شود، عدم وجود یکی از آن‌ها وجود دیگری را دچار مشکل نمی‌سازد.

در مطالعات مختلف که برای یافتن جانشین‌های مناسب برای عوارض پوستی انجام پذیرفته، سایتوکاین‌ها به‌عنوان بیومارکرها ارزشمند معرفی شده‌اند. در مطالعه دیچمن (Deichmann) و همکاران او (۲۰۰۰)، سطح سرمی بیومارکرها ایترلوکین ۶ (IL\_6) و CRP به‌عنوان مارکرها سرمی مفید برای لاکتان دهیدروژناز مقایسه شده‌اند [۱۶]. در این مطالعه، حساسیت جانیشینی IL\_6 او CRP به ترتیب ۸۶ درصد و ۷۶ درصد برآورد شده و بیش‌ترین ویژگی برای لاکتان دهیدروژناز (۹۴ درصد) برآورد شده است. آزمون‌های آماری برای سنجش اعتبار جانیشینی این فاکتورها در تشخیص ملانوم بدخیم از نوع خوش خیم آن، نشان داد که این فاکتورها توانایی بالا برای این تشخیص را دارند [۱۶].

در مطالعه دیگری به منظور یافتن جانشین‌های مناسب در بیماران ضایعات نخاعی که از زخم بستر رنج می‌برند، در ترمیم ضایعات پوستی ایجاد شده، قدرت جانیشینی سطح سرمی سایتوکاین‌های IL\_6 گیرنده‌های IL\_2R و ICAM\_1 بررسی گردیده است [۱۸]. این مطالعه نشان داد که در بیماران ضایعه نخاعی با زخم بستر، میزان IL\_2R و ICAM\_1 می‌تواند در تشخیص، پیش‌آگاهی و ارزیابی درمانی در تشخیص این‌که وضعیت زخم به سمت بهبود و ترمیم می‌رود یا تشدید می‌شود، ارزشمند باشد [۱۸]. در مطالعه حاضر، سطح IFN\_g در مایع رویی کشت

نقاط پایانی کلینیکی باشند، مد نظر محققین است. سایتوکاین‌ها از جمله مدیاتورهای مهم پاسخ‌های ایمنی، فرایندهای التهابی و ترمیم یافتن در پوست و سایر ارگان‌ها هستند [۱۸]. فعال شدن این واسطه‌های ایمنی و تجمع یافتن آن‌ها می‌تواند با تغییرات پاتولوژیک یا بهبود ضایعات پوستی همراه باشد و افزایش سطح سرمی آن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده فعالیت ایمنی باشد [۱۸]. در بررسی حاضر که بر روی ۵۰۰ نفر از ساکنین منطقه سردشت (مصدومین شیمیایی) و ربط (گروه کنترل) صورت پذیرفته، بررسی اعتبار جانیشینی ۱۶ فاکتور ایمنی (۴ حالت سنجش مختلف از ۴ فاکتور) در دو سطح فردی و آزمایش مورد بررسی قرار گرفته است.

برای بررسی اعتبار در سطح فردی، تنها ۴ فاکتور از ۱۶ فاکتور مورد بررسی، شرایط اولیه برای ورود به فرایند اعتبارسنجی تحت مواجهه شیمیایی با گاز خردل را دارا بودند. در ۴ فاکتور مورد بررسی، مقدار LRF که اندازه اعتبار در سطح فردی، پیشنهاد شده توسط آلونسو همکاران او (۲۰۰۶) است و نشان‌دهنده میزان همبستگی بین دو نقطه پایانی کلینیکی و جانشین به ازای هر فرد پس از تعدیل اثر مداخله است، محاسبه شده است. مقادیر جدول ۲ نشان می‌دهد که اعتبار در سطح فردی در تمام این فاکتورها بسیار پایین است و هیچ‌یک از این فاکتورها نمی‌تواند جانیشینی مناسب در سطح فردی برای وجود یا عدم وجود عارضه پوستی بر اساس دستورالعمل تأیید شده در کمیسیون پزشکی بنیاد شهید و امور ایثارگران تحت مواجهه با گاز شیمیایی خردل باشد. جانیشینی در سطح فردی و اندازه اعتبار آن می‌تواند به پزشکان متخصص برای تشخیص، تشخیص افتراقی، اندازه شدت و پیشرفت بیماری و پاسخ به درمان در بیماران، ارزیابی توانایی یک درمان جدید، و پیش‌آگاهی استفاده شود.

به منظور بررسی اعتبار در سطح آزمایشی، مقدار PE به وسیله روش پیشنهادی ملنبرگ و همکاران او (۲۰۰۱) که به صورت خاص جهت داده‌های پیوسته \_ گسسته معرفی شده‌اند، محاسبه گردید. نتایج  $\alpha$  و  $\beta$  استاندارد و تعدیل شده، به صورت خاص محاسبه شده‌اند. مقدار اعتبار آزمایشی در این فاکتورها نشانگر آن نسبت از اثر مداخله روی نقطه انتهایی کلینیکی است که روی نقطه انتهایی جانشین دیده می‌شود. مقدار نهایی PE در جدول ۲ نشان

میزان اعتبار جانشینی آن‌ها در تشخیص‌های پوستی مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

۳. با توجه به سختی کشت سلول با روش مورد استفاده در این مطالعه، پیشنهاد می‌شود سطح سرمی سایتوکاین‌ها به‌ویژه سایتوکاین‌های التهابی بدین منظور مورد بررسی قرار گیرد.

### ضمیمه

برای بررسی اعتبار در سطح فردی از روش LRF ابتدا باید سه مدل زیر بر اساس سه‌تایی (T,S,Z) بر داده‌ها برازش داده شوند. متغیر پاسخ کلینیکی (T) در این‌جا متغیری کیفی و ۲ حالتی است که نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود عارضه پوستی به تشخیص پزشک متخصص پوست است. متغیر پاسخ جانشین (S) یک متغیر کمی پیوسته است که توسط آزمایشگاه اندازه‌گیری شده‌است. متغیر Z یک متغیر دو حالتی است که نشانگر وجود یا عدم وجود مداخله شیمیایی بر فرد است.

$$\text{Logit}(\pi_i^{\text{TIZ}}) = \mu_T + \beta Z_i \quad (1)$$

$$\text{Logit}(\pi_i^{\text{TIS}}) = \mu_T^S + \beta^S Z_i + \gamma^S S_i \quad (2)$$

$$E(S) = \mu_S + \alpha Z_i \quad (3)$$

$$(\pi_i^{\text{Tis}}) = \sigma(\text{TIS}), \pi_i^{\text{T}} = E(T)$$

$$i = 1, \dots, n$$

برای متغیر ایمنی IFN-G در حضور میتوزن به صورت نمونه محاسبات به صورت باز انجام می‌گیرد. نتیجه برازش مدل‌ها برای این متغیر برای مثال به صورت زیر بود:

$$\text{Logit}(\pi_i^{\text{TIZ}}) = -0.191 - 1.837 Z_i \quad (4)$$

(P-value<0.001)

$$\text{Logit}(\pi_i^{\text{TIS}}) = -0.465 - 1.977 Z_i + 0.054 S_i \quad (5)$$

(P-value=0.041)

$$E(S) = 7.54 - 1.435 Z_i \quad (6)$$

(P-value=0.025)

برای بررسی اعتبار متغیر ایمنی IFN-G در حضور میتوزن استفاده از ملاک LRF داریم:

$$G^2 \leq 1.25 \Rightarrow \text{LRF} = 1/45 \quad (\text{P-value}=0.041)$$

سلول‌های خونی با تحریک میتوزنی می‌تواند تا حدود زیادی بیانگر وضعیت کلی ضایعات پوستی مصدومین شیمیایی باشد.

هر چند استفاده بجای از یک جانشین معتبر ممکن است این مزیت را داشته باشد که بتوانیم به صورت واضح‌تر مراحل پیشرفت بیماری و آثار مداخله روی آن را بررسی کنیم؛ ولی خطر استفاده از جانشین‌ها، بدون بررسی دقیق اعتبار آن‌ها می‌تواند منجر به یک تصمیم نادرست در فرایند تشخیص یا درمان شود که ممکن است باعث توقف یا ادامه یک روش درمانی یا دارویی باشد که این مسأله می‌تواند خطر بالایی برای بیماران در بر داشته باشد [۲۱]. پس باید توجه داشت که هرچند استفاده از جانشین‌های خوب بسیار مطلوب است، ولی خطرهای استفاده از جانشین‌های ضعیف نیز واضح است.

فلمنینگ (Fleming) نشان داد علائم بیولوژیکی زیادی وجود داشته‌اند که به‌عنوان جانشین در مطالعات کارآزمایی مهم و برجسته استفاده شده‌اند؛ ولی کفایت لازم برای جانشینی را دارا نبوده‌اند [۲۸]. بنابراین، او پیشنهاد کرد که قبل از استفاده از جانشین‌ها برای قضاوت بر روی آثار یک مداخله به جای استفاده از نقاط پایانی کلینیکی، محققان و پزشکان باید به وجود و ثبات رابطه بین جانشین و هدف توجه داشته باشند. نیز اشاره کرد که اثر مداخله روی نقطه پایانی جانشین باید بزرگ، دقیق و با ثبات باشد.

### پیشنهادها

۱. برای اطمینان از این‌که جانشین‌های یافت شده در این مطالعه مناسب‌ترین جانشین برای تعیین عوارض پوستی بر اساس دستورالعمل بنیاد هستند لازم است سایر متغیرهای احتمالی، شامل سایر فاکتورهای ایمنی و بخصوص مدیاتورهای التهابی نیز مورد بررسی قرار گیرد و میزان اعتبار آن‌ها به منظور جانشینی عوارض فوق‌الذکر مشخص شود.

۲. از آن‌جا که در بررسی‌های بالینی، ضایعات متفاوت دارای بیومارکرهای جانشین مختلف هستند، لذا پیشنهاد می‌گردد ارتباط این فاکتورها با تک تک عوارض پوستی شیمیایی به صورت جداگانه بررسی و

Clinical Trials 2001; 22:485-502. DOI: 10.1016=S0197-2456(01)00153-2

13. Prentice RL. Surrogate endpoints in clinical trials: de\_nition and operational criteria. *Statistics in Medicine* 1989; 8:431- 440.
14. Mastroianni A, Minutilli E, Mussi A, Bordignon V, Trento E, D'Agosto G, Cordiali-Fei P, Berardesca E. Cytokine profiles during infliximab monotherapy in psoriatic arthritis. *Br J Dermatol.* 2005; 153(3):531-6.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Cellular and Molecular Immunology, International Edition, 6<sup>TH</sup> Edition, Saunders Elsevier press; 2007: p, 267-303
16. Deichmann M, Benner A, Waldmann V, Bock M, Jackel A, Naher H, Interleukin\_6 and its surrogate C\_reactive protein are useful serum markers for monitoring metastasized malignant melanoma, *J Exp Clin Cancer Res.* 2000; 19(3):301-7.
17. Schiffenbauer J, Hahn B, Weisman MH, and Simon LS, Biomarkers, Surrogate markers, Design of clinical trials of new therapies for systemic Lupus ergthma tosus. *Arthy.& Rheum.* 2004, 50(8): 2415\_2422.
18. Segal JL, Gonzales E, Yousefi S, Jamshidipour L, Brunnemann SR, Circulating Levels of IL-2R, ICAM-1, and IL-6 in spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997; 78(1): 44-7.
19. Baker S. G. & Kramer B. S., A perfect correlate does not a surrogate make, *BMC Medical Research Methodology,* 2003, 3:16.
20. Editorial., Surrogate markers: Back to the future (Special Papers for the 25th Anniversary of Statistics in Medicine), *Statistics in Medicine, Statist. Med.;* 2006; 25:181-182.
21. Weir1 C. J. & Walley R. J. Statistical evaluation of biomarkers as surrogate endpoints: a literature review, *Statist. Med.;* 2006; 25:183-203.
22. Prentice RL. Surrogate endpoints in clinical trials: de\_nition and operational criteria. *Statistics in Medicine* 1989; 8:431- 440.
23. Freedman LS, Graubard BI, Schatzkin A. Statistical validation of intermediate endpoints for chronic diseases. *Statistics in Medicine* 1992; 11:167-178.
24. Buyse M, Molenberghs G. Criteria for the validation of surrogate endpoints in randomized experiments. *Biometrics* 1998; 54:1014 -1029.
25. Alonso A, Molenberghs G, Geys H, Buyse M & Vangeneugden T. A unifying approach for surrogate marker validation based on Prentice's criteria, *Statist. Med;* 2006; 25:205-221.
26. Ghazanfari T, Faghihzadeh S, Aragizadeh H. Historical Cohort Study of Chemical Warfare Victims, 20 Years after Sulfur Mustard Exposure (Sardasht- Iran Study): Design and Methods, *Arch. Iranian Mod* 2009; 12(1): 5-14.
27. Balali-Mood M, Hefazi M: The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19:297-315.
28. Fleming TR and DeMets DL. Surrogate end points in clinical trials: Are we being misled?, *Annals of Internal Medicine,* 1996; 125:605-613.

این مقاله بخشی از طرح مصوب گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد و پژوهشکده مهندسی و علوم پزشکی بنیاد جانبازان است.

## 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 gGas. *Ann Epidemiol* 2000; 10:333-338.
3. Khateri S, 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. *J Occup 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 following large-Scale Wartime exposure to sulfur mustard. *Journal of Burns & Surgical Wound Care* 2003; 2:7-18.
5. Momeni AZ, Enshaeih S, Meghdadi M, Amindjavaheri M: Skin manifestations 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. Lesko LJ, Atkinson AJJ. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2001; 41:347-366.DOI:10.1146=annurev.pharmtox.41.1.347.
8. Temple RJ. Are surrogate markers adequate to assess cardiovascular disease drugs? *Journal of the American Medical Association* 1999; 282:790 -795.
9. Biomarkers De\_nitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred de\_nitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2001; 69:89-95. DOI: 10.1067=mcp.2001.113989.
10. Boissel JP, Collet J-P, Moleur P, Haugh M. Surrogate endpoints: a basis for a rational approach. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1992; 43:235 -244.
11. Chuang-Stein C, DeMasi R. Surrogate endpoints in AIDS drug development: current status. *Drug Information Journal* 1998; 32:439-448.
12. De Gruttola V, Clax P, DeMets DL, Downing GJ, Ellenberg SS, Friedman L, Gail MH, Prentice R, Wittes J, Zeger SL. Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials: summary of a National Institutes of Health workshop. *Controlled*