

آنالیز متابولومیکس بر اساس رزونانس مغناطیسی هسته در بیماران در معرض قرار گرفته با گاز خردل با استفاده از روش رندوم فارست

بی بی فاطمه نوبخت مطلق قوچانی^۱ (Ph.D)، رسول علیان‌نژاد^۲ (M.D)، افسانه عارفی اسکویی^۳ (Ph.D)، فریبا فتحی^۴ (Ph.D)، حسینعلی صفاخواه^۴ (M.Sc)، مصطفی رضایی طاویرانی^{۱*} (Ph.D)

۱ - مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲ - بخش ریه، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳ - گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴ - گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران
۵ - مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: متابولومیک تکنیکی توانمند برای تعیین بیومارکرهاست. در این تحقیق، پروفایل متابولومیکی متمایز بین سطوح مختلف بیماران در معرض قرار گرفته با گاز خردل گوگردی تعیین شد. مواد و روش‌ها: از اسپکتروسکپی رزونانس مغناطیسی هسته به منظور آنالیز نمونه‌های سرم از ۱۷ بیمار نرمال شیمیایی و ۱۷ بیمار با آسیب ریوی شدید استفاده شد. سپس، آنالیز آماری چندمتغیره با استفاده از رندوم فارست بر روی گروه آموزش (۷۰٪ کل نمونه‌ها) به منظور تولید مدل تمایزدهنده دو گروه بیمار انجام شد، و مدل با باقی‌مانده افراد تست گردید. یافته‌ها: طبقه‌بندی مدل با استفاده از گروه آموزش با سطح زیر منحنی راک (AUC) ۰/۸۷ مشتق شد. در گروه تست (باقی‌مانده ۳۰٪ نمونه‌ها) AUC ۰/۸ بود، بنابراین مدل رندوم فارست قدرت پیش‌گویانه خوبی داشت. نتایج تغییرات معنی‌داری در متابولیسم لیپیدها، آمینواسیدها و انرژی بین دو گروه بیمار را نشان داد. نتیجه‌گیری: اسپکتروسکپی رزونانس مغناطیسی هسته سرم با موفقیت دو گروه بیمار در معرض گاز خردل قرار گرفته را متمایز می‌کند. این تکنیک، شناسایی مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک جدید، روش تشخیصی، بیومارکرها و اهداف دارویی جدید را فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: گاز خردل، سرم، متابولومیکس.

مقدمه

ایرانی توسط این گاز صدمه ببینند و یک‌سوم این افراد هنوز از اثرات بلندمدت این گاز رنج می‌برند [۱]. برخی عوارض این گاز دیررس می‌باشند که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: بیماری‌های انسدادی مزمن ریوی، فیبروز ریوی و چندین نوع سرطان از جمله سرطان ریه و دستگاه گوارش.

گاز خردل گوگردی یک عامل تاول‌زا است که به‌عنوان سلاح شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طبق آمارهای موجود آخرین استفاده نظامی که از آن شده است در جنگ ایران و عراق بوده است و باعث شد بیش از ۱۰۰۰۰۰ نفر

معنی‌داری بین بیماران و گروه کنترل متفاوت هستند انتخاب و به‌عنوان کاندید برای بیومارکر تشخیصی بیماری معرفی می‌گردند.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه. در این مطالعه، ۷۹ بیمار با مشکلات ریوی از بین بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک بیماران شیمیایی بیمارستان ساسان از خرداد ۱۳۹۱ تا آبان ۱۳۹۲ انتخاب شدند. پرونده تمام بیماران از طریق بنیاد شهید مورد بررسی قرار گرفت، در پرونده برخی از بیماران در معرض قرار گرفتن با خردل ثبت نشده بود و برخی بیماران در معرض گاز اعصاب، برخی در معرض موج انفجار قرار گرفته بودند، که تمام این بیماران و هم‌چنین بیماران شیمیایی که دارای بیماری‌های قلبی، دیابت و غیره بودند از مطالعه خارج شدند. در نهایت تعداد ۳۴ بیمار در دو سطح از نظر شدت بیماری ریوی (نرمال و شدید) مورد بررسی قرار گرفتند.

میزان انسداد مسیرهای هوایی بیماران شیمیایی مطابق با راهنمای GOLD بر اساس حجم‌های ریوی به ۵ سطح تقسیم شدند: نرمال، ملایم، متوسط، شدید و خیلی شدید [۱۱]. نرمال شیمیایی، بیمارانی هستند که در معرض گاز خردل قرار گرفته‌اند و دارای حجم بازدمی فشاری در ثانیه اول (FEV_1) بیش‌تر از ۸۰٪ و نسبت حجم بازدمی فشاری در ثانیه اول به ظرفیت حیاتی اجباری (FVC) بیش‌تر از ۷۰٪ هستند (چون این افراد از نظر ریوی مشابه افراد نرمال هستند به آن‌ها نرمال شیمیایی اطلاق می‌گردد). بیماران شدید هم بیمارانی با مشکلات ریوی و حجم‌های ریوی $FEV_1 < 30\%$ و $FEV_1/FVC < 70\%$ هستند.

برای هر فرد پرسش‌نامه‌ای شامل مشخصات دموگرافیک، سال مجروحیت، مصرف دخانیات و سابقه بیماری‌های ریوی در خانواده و موارد دیگر تکمیل گردید. هم‌چنین رضایت بیماران جهت گرفتن خون جلب شد. از همه افراد بیمار اسپرومتری گرفته شد، بر اساس FEV_1 بیماران ریوی شیمیایی به ۲ گروه نرمال شیمیایی و شدید تقسیم شدند. شرایط ورود به مطالعه شامل موارد ذیل است: (۱) مدارک کافی دال بر مواجه با گاز خردل و این‌که بیماری ریوی در بیمار در

آمار قربانیان ایرانی تا تاریخ ۱۳۸۶ که در اثر تماس با گاز خردل دچار عوارض دیررس ریوی گشته‌اند به ۴۵۰۰۰ نفر می‌رسد [۲]. مطابق طبقه‌بندی‌های انجام شده بیش‌ترین آسیب بیماران شیمیایی شامل آسیب‌های ریوی، چشم‌ها و پوست بوده است [۳]. هم‌اکنون تشخیص این بیماری از طریق تست عمل‌کرد ریه (PFT)، توموگرافی کامپیوتری با قدرت تفکیک بالا (HRCT) و برونکوسکوپی می‌باشد [۴-۷]. بهترین روش تشخیصی عوارض این گاز شیمیایی بیوپسی است که روشی تهاجمی است و امکان آسیب‌رسانی به ریه بیماران بسیار بالاست. به دلیل روش تشخیصی دشوار، اکثر بیماران از انجام بیوپسی امتناع کرده که سبب می‌شود بررسی وضعیت دقیق این افراد مشکل باشد.

متابولیت‌ها مولکول‌های کوچکی هستند که معمولاً وزن آن‌ها کم‌تر از ۱۰۰۰ دالتون است. آن‌ها شامل آلدئیدها، کتون‌ها، استرها، کربوکسیلیک اسیدها، قندها، آمینواسیدها و غیره می‌باشند. متابولومیک به اندازه‌گیری کمی پاسخ‌های متابولیک سیستم‌های زیستی به تحریک‌های مختلف از جمله پاتوفیزیولوژی یا تغییرات ژنتیک، با تأکید ویژه بر توضیح اختلافات در گروه‌های جمعیتی به بررسی علت تغییرات ژنتیکی، بیماری و استرس‌های محیطی می‌پردازد [۸]. مزیت اصلی در استفاده متابولومیک شناسایی صدها متابولیت در یک راستا می‌باشد که روش کارآمدی جهت بررسی بیوشیمی تغییر یافته است [۹]. در بین تکنیک‌های آنالیزی که جهت کاربردهای متابولومیکی استفاده می‌شود، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR) و طیف‌سنجی جرمی (MS) روش‌های رایج‌تری هستند. طیف‌سنجی NMR یکی از بهترین روش‌های آنالیز مخلوط‌های چند ترکیبی شناخته شده است، این تکنیک نیاز به آماده‌سازی نمونه اندکی دارد، سریع می‌باشد، غیر مخرب و غیر تهاجمی است [۱۰].

تاکنون مطالعه متابولومیکی بر روی بیماران شیمیایی انجام نشده است. در این مطالعه با استفاده از NMR پروفایل متابولیتی سرم بیماران شیمیایی در دو سطح بیماری (بیماران نرمال و شدید شیمیایی) با هم مقایسه و متابولیت‌های افتراقی بین دو گروه مشخص می‌شوند. متابولیت‌هایی که به‌طور

آماده‌سازی اطلاعات حاصل از NMR جهت آنالیز آماری و شناسایی متابولیت‌ها. در این مرحله هر طیف NMR باید تبدیل به عدد گردد. بدین منظور از نرم‌افزار پرومتاب در محیط MATLAB (نسخه ۷,۶,۰) استفاده شد. با استفاده از این نرم‌افزار هم می‌توان طیف‌های NMR را مشاهده و نیز طیف‌ها را به قسمت‌های کوچک‌تر تقسیم نمود. طیف‌ها به ۴۰۸ قسمت یا "بین" تقسیم شدند (فاصله ۰/۲ تا ۱۰ ppm به فواصل ۰/۲ تقسیم گردیدند) و سپس توسط ProMetab تصحیح پایه و حذف پیک آب صورت گرفت. به علت بزرگ بودن پیک آب، پیک‌های کوچک‌تر مشاهده نمی‌گردند بنابراین جهت مشاهده پیک‌های کوچک‌تر پیک آب حذف می‌گردد. سرانجام طیف‌ها نرمال و هم‌تراز شدند.

پس از هم‌ترازی طیف‌ها، همه طیف‌های پیش‌پردازش شده به شکل ماتریس درآمده و وارد نرم‌افزار اکسل گردیدند (هر گروه شامل یک ماتریس ۱۷ در ۴۰۸ می‌باشد). ماتریس حاصله جهت انجام آنالیزهای چندمتغیره و تعیین "بین‌های" متفاوت بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. هر بین مربوط به متابولیت خاصی است که می‌توان آن را با وارد کردن به پایگاه داده متابولوم انسان (<http://www.hmdb.ca>) یا با استفاده از مقالات موجود شناسایی کرد.

آنالیز آماری. ماتریس حاصله از طیف‌های NMR با استفاده از روش آنالیز آماری چندمتغیره رندوم فارست (RF) در محیط MATLAB به منظور کاهش ابعاد متغیرها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفاوت بین مقدار میانگین‌های خصوصیات دموگرافیک و حجم‌های ریوی در بین دو گروه از بیماران با استفاده از SPSS و با روش آزمون t مستقل انجام شد. به منظور ارزیابی مدل منحنی ROC رسم شد.

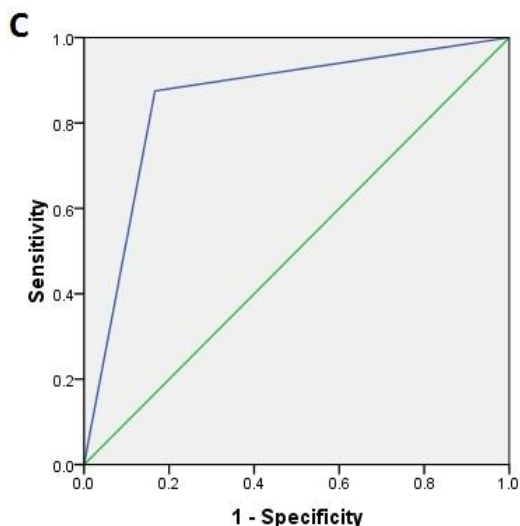
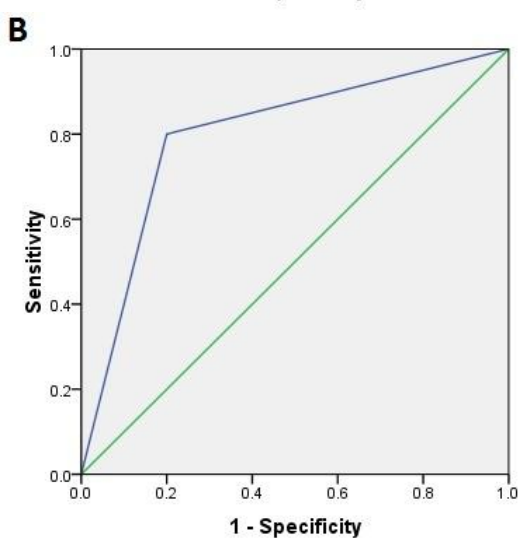
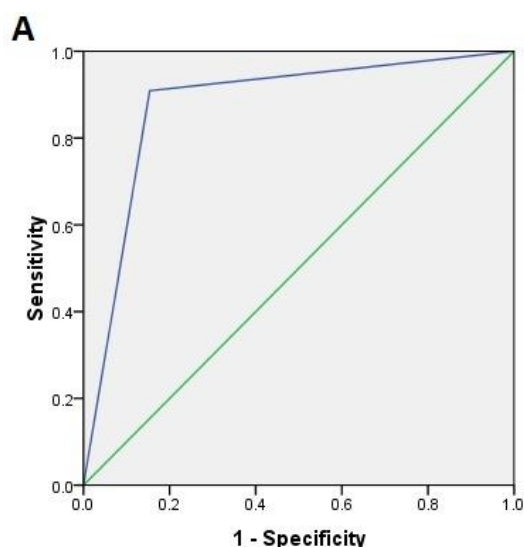
نتایج

خصوصیات دموگرافیک و حجم‌های ریوی افراد مورد بررسی در این پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده است. ماتریس پیش‌پردازش شده حاصل از مرحله قبل که شامل ناحیه ۰/۲-۱۰ ppm مربوط به طیف‌های NMR بود به منظور بررسی متابولیت‌های افتراقی سرم بین دو گروه بیمار با روش

اثر مواجه با گاز خردل ایجاد شده است وجود داشته باشد، ۲) بیماران از نظر تنفسی در شرایط پایدار باشند (یعنی این‌که در یک ماه اخیر تشدید بیماری یا عفونت ویروسی نداشته باشند، داروهای ضد التهاب یک هفته قبل قطع شده باشد (در مورد افراد شدید قطع دارو صورت نگرفت)، ۳) سایر بیماری‌های مداخله‌گر از قبیل دیابت، سایر بیماری‌های ریوی، قلبی و موارد دیگر در فرد وجود نداشته باشند، ۴) مصرف دخانیات در بیماران (نه قبلاً و نه در حال مطالعه) وجود نداشته باشد و سن و جنس (در این مطالعه فقط از جنس مذکر استفاده شد) نیز از عوامل مخدوش‌کننده است که باید در گروه‌های مختلف بیماران و کنترل در محدوده نزدیک به هم باشند. شرایط خروج از مطالعه شامل موارد ذیل است: ۱) به سایر بیماری‌های تنفسی از جمله آسم، بیماری انسدادی مزمن ریه COPD (به علت مصرف سیگار) و همچنین سایر بیماری‌های دیگر مبتلا باشند، ۲) عدم رضایت بیمار جهت همکاری، ۳) سیگاری بودن و ۴) در شرایط پایدار نبودن بیمار.

از هر بیمار نمونه‌های خون در بیمارستان ساسان گرفته شد و پس از جداسازی سرم، بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت و در فریزر -80°C تا هنگام استفاده نگهداری شد.

آماده‌سازی نمونه و گرفتن طیف‌های پروتن NMR ($^1\text{H-NMR}$) از طریق CPMG. طیف $^1\text{H-NMR}$ برای تعیین متابولیت‌ها در دستگاه Bruker DRX ۵۰۰ MHz در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز (MHz) به روش CPMG گرفته شد. ۶۰۰ میکرولیتر سرم در لوله‌های ۵ میلی‌متری با کیفیت بالا به ۶۰ میکرولیتر D_2O (جهت لاک کردن دستگاه) اضافه شد و داخل دستگاه قرار گرفت. برای همه نمونه‌ها توالی پالس پژواک-اسپین CPMG گرفته شد. در روش CPMG رزونانس پهن ترکیبات با وزن مولکولی بالا از جمله پروتئین‌ها کاهش می‌یابد و باعث می‌شود مشاهده ترکیبات با وزن مولکولی پایین از جمله متابولیت‌ها تسهیل گردد [۱۲]. همه طیف‌ها به متیل لاکتات (سیگنال دوتایی در ۱/۳۳ ppm) ارجاع داده شدند. سایر پارامترهای انجام آزمایش عبارت‌اند از: دمای ۲۹۸ کلوین (K)، تعداد اسکن ۱۵۴، پهنای پیک Hz ۸۳۸۹/۲۶ و زمان پالس ۲ ثانیه.



شکل ۱. منحنی ROC برای (A) گروه آموزش، (B) گروه تست و (C) کل نمونه‌ها با استفاده از آنالیز رندوم فارست. مقادیر سطح زیر منحنی برای گروه آموزش، تست و کل به ترتیب ۰/۸۷، ۰/۸ و ۰/۸۵ می‌باشند.

رندوم فارست در محیط MATLAB آنالیز گردید. ناحیه ۰/۹ تا ۴/۲ ppm شامل متابولیت‌های متمایزکننده بین دو گروه شناسایی شد. آنالیز رندوم فارست ۱۴ نفر از ۱۷ بیمار نرمال شیمیایی (۸۲٪) و ۱۵ نفر از ۱۷ بیمار با آسیب ریوی شدید شیمیایی (۸۸٪) را شناسایی کرد. کانفیوژن ماتریس (ماتریس درهم‌ریختگی) گروه آموزش و تست مربوط به مدل در جدول ۲ نشان داده شده است. کانفیوژن ماتریس شامل طبقه‌بندی‌های واقعی و پیشگویی شده انجام یافته توسط مدل است. جهت ارزیابی و اعتبار سنجی مدل، نمودار ROC مربوط به این مدل در گروه آموزش و تست و کل مدل ترسیم شد (شکل ۱) و سطح زیر منحنی این نمودار ۰/۸۵ به دست آمد. ویژگی، حساسیت و دقت مدل در گروه آموزش در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱. خصوصیات دموگرافیک و ریوی نمونه‌ها

متغیر	نرمال شیمیایی	شدید شیمیایی
تعداد نمونه	۱۷	۱۷
سن (سال)	۴۷/۵۳ ± ۴/۹۸	۷/۷۹ ۴۷/۸۸ ±
قد (سانتی‌متر)	۸/۱۶	۶/۸ ۱۷۴/۰۵ ± ۱۷۱/۳۵ ±
وزن (کیلوگرم)	۷۹/۲۳ ± ۸/۴۷	۷۴/۲۳ ± ۱۵/۸۶
BMI (kg/m ²)	۲۶/۲۱ ± ۲/۹	۲۵/۲۹ ± ۵/۴۳
FEV ₁ (%)	۱۴/۶۵ ۸۵/۰۵ ±	۲۹/۸۸ ± ۱۱/۵۳ ^a
FVC (%)	۱۳/۴۹ ۸۳/۲۳ ±	۴۲/۰۵ ± ۱۶/۰۰ ^a
FEV ₁ /FVC (%)	۸۲/۸۸ ± ۶/۰۲	۵۷/۱۲ ± ۱۱/۷۵ ^a

مقادیر استفاده شده انحراف معیار ± میانگین می‌باشند. a: p<0.001

جدول ۲. کانفیوژن ماتریس (ماتریس درهم‌ریختگی) برای گروه آموزش و تست حاصل از مدل رندوم فارست

گروه	مشاهده شده	پیشگویی شده	گروه
	شدید شیمیایی	نرمال شیمیایی	
گروه آموزش	۱۱	۱	شدید شیمیایی
	۲	۱۰	نرمال شیمیایی
گروه تست	۴	۱	شدید شیمیایی
	۱	۴	نرمال شیمیایی

جدول ۳. شاخص‌های بیان‌کننده قدرت پیش‌گویانه مدل رندوم فارست

گروه	دقت حساسیت	ویژگی	میزان غیرخطا	میزان خطا
گروه آموزش	۰/۸۷	۰/۸۵	۰/۹۱	۰/۸۷
گروه تست	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۲

پس از شناسایی نواحی متمایز بین دو گروه، متابولیت‌های مربوطه شناسایی شد که عبارت‌اند از: افزایش در سطح سرمی استات، استواسات، گلیسرول، استیل کارنیتین، کولین، پرولین، هیدروکسی پرولین، لیزین، گلوتامات، کراتینین و دی متیل آمین و کاهش در سطح سرمی لیپیدها از جمله آپولیپروتئین با دانسیته کم در بیماران با آسیب ریوی شدید شیمیایی در مقایسه با نرمال شیمیایی.

بحث و نتیجه‌گیری

متابولومیک غیر هدفمند برای کشف بیومارکرها بسیار مناسب است و با استفاده از آن می‌توان به بررسی پروفایل همه متابولیت‌های قابل شناسایی در یک آزمایش پرداخت. این روش شناسایی مارکرها متابولیتی چندگانه بیماری را امکان‌پذیر می‌سازد و می‌تواند مکانیسم‌های ایجاد بیماری را شرح دهد. در این پژوهش بررسی متابولومیک نمونه‌های سرم بیماران شیمیایی در معرض گاز خردل قرار گرفته به منظور کشف بیومارکرها می‌تواند بیماران را دقیق‌تر از روش HRCT (روش غیر تهاجمی با دقت کم) و روش کم‌تر تهاجمی نسبت به بیوپسی (که در حال حاضر جهت تشخیص بیماری استفاده می‌شوند) شناسایی کنند انجام شده است.

استفاده از NMR در متابولومیک منجر به آنالیز متابولیت‌های بیماری‌های متعدد گردیده است و نتایج مفیدی داشته است [۱۳-۱۶].

هم‌چنان که در قسمت نتایج ذکر شد در بیماران با آسیب ریوی شدید استواسات (اجسام کتونی که در نتیجه بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب تشکیل می‌گردد)، استات (محصول نهایی متابولیسم لیپیدها)، استیل کارنیتین (در اثر اکسیداسیون لیپیدها)، کراتین (از هیدرولیز کراتین فسفات ایجاد شده و تولید انرژی می‌کند)، کولین (از هیدرولیز فسفولیپیدها

ایجاد شده و یکی از علل آن هیپوکسی بافتی می‌باشد) و گلیسرول (از هیدرولیز فسفولیپیدها یا آپولیپروتئین‌ها ایجاد می‌گردد) افزایش می‌یابند. متابولیت‌های ذکر شده همه در ارتباط با تجزیه لیپیدها و تولید انرژی است که در سرم بیماران شیمیایی با آسیب ریوی شدید نسبت به نرمال شیمیایی بالا رفته‌اند و نشان‌دهنده افزایش β -اکسیداسیون اسیدهای چرب در گروه آسیب ریوی شدید در مقایسه با نرمال شیمیایی است.

از طرف دیگر آمینواسیدهای مرتبط با تجزیه کلاژن یعنی لیزین، پرولین و هیدروکسی پرولین در سرم بیماران با آسیب ریوی شدید افزایش یافته است، که احتمالاً به علت افزایش فعالیت کلاژناز و تجزیه کلاژن، خصوصاً در استخوان‌ها و چشم می‌باشد. افزایش سطوح این آمینواسیدها را می‌توان با تخریب کلاژن مرتبط دانست [۱۷، ۱۸]. این نتیجه با مطالعات آژین و نادری که گزارش کردند در معرض گاز خردل قرار گرفتن موجب افزایش پوکی استخوان و استئوپنی و هم‌چنین تخریب کلاژن قرنیه می‌شود، هماهنگ است [۱۹، ۲۰]. با توجه به این‌که فقدان کلاژن استخوان در پوکی استخوان رخ می‌دهد، نتایج نشانگر آسیب‌های استخوانی می‌باشند [۲۱]. گروهی از محققان سرعت پوکی استخوان را در بیماران آسی و بیماران در معرض گاز خردل قرار گرفته که کورتیکواستروئیدها را به‌عنوان درمان برای امراض ریوی مزمن استفاده می‌کردند ارزیابی کردند. نتایج حاکی از آن بود که خردل سرعت پوکی استخوان را افزایش می‌دهد [۲۰]. به عبارت دیگر نمی‌توان گفت که مصرف کورتیکواستروئیدها موجب پوکی استخوان شده است زیرا دو گروه (بیمار شیمیایی و آسی) این دارو را مورد استفاده قرار دادند. باید توجه داشت که انواع مختلف کلاژن حدود ۱۵٪ وزن خشک بافت ریه انسان را تشکیل می‌دهد و گروه پروتئینی مهمی هستند. نوع یک و سه فراوان‌ترین کلاژن‌های ریه هستند که در مسیرهای هوایی، رگ‌های خونی و به‌علاوه در میان بافت پراکنده می‌باشند [۲۲]. احتمالاً تغییر فعالیت کلاژناز در این بیماران می‌تواند

- victims living in Babol (North of Iran). *Ecotoxicol Environ Saf* 2002; 53: 422-424.
- [7] Bagheri M, Hosseini S, Mostafavi S, Alavi S. HIGH-Resolution CT in chronic pulmonary changes after mustard gas exposure. *Acta Radiol* 2003; 44: 241-245.
- [8] Griffiths WJ. *Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2008. p. 283-285.
- [9] Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: D521-D526.
- [10] Gowda GN, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 617-633.
- [11] Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555.
- [12] Brown FF, Campbell ID, Kuchel PW, Rabenstein DC. Human erythrocyte metabolism studies by 1H spin echo NMR. *FEBS Lett* 1977; 82: 12-16.
- [13] Nobakht MGBF, Aliannejad R, Rezaei-Tavirani M, Taheri S, Oskouie AA. The metabolomics of airway diseases, including COPD, asthma and cystic fibrosis. *Biomarkers* 2015; 20: 5-16.
- [14] Fathi F, Kyani A, Rostami Nejad M, Rezaye-Tavirani M, Naderi N, Zali MR, et al. A metabonomics study on crohn's disease using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Health MED* 2012; 6: 3577-3584.
- [15] Fathi F, Ektefa F, Arefi Oskouie A, Rostami K, Rezaei-Tavirani M, Mohammad Alizadeh AH, et al. NMR based metabonomics study on celiac disease in the blood serum. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2013; 6: 190-194.
- [16] Rezaei-Tavirani M, Fathi F, Darvizeh F, Zali MR, Rostami Nejad M, Rostami K, et al. Advantage of applying OSC to (1) H NMR-based metabonomic data of celiac disease. *Int J Endocrinol Metab* 2012; 10: 548-552.
- [17] Schiller J, Naji L, Huster D, Kaufmann J, Arnold K. 1H and 13C HR-MAS NMR investigations on native and enzymatically digested bovine nasal cartilage. *MAGMA* 2001; 13: 19-27.
- [18] Keshari KR, Zektzer AS, Swanson MG, Majumdar S, Lotz JC, Kurhanewicz J. Characterization of intervertebral disc degeneration by high-resolution magic angle spinning (HR-MAS) spectroscopy. *Magn Reson Med* 2005; 53: 519-527.
- [19] Naderi M, Jadidi K, Falahati F, Alavi SA. The effect of sulfur mustard and nitrogen mustard on corneal collagen degradation induced by the enzyme collagenase. *Cutan Ocul Toxicol* 2010; 29: 234-240.
- [20] Agin K, Rajae A, Mehrabi M, Darjani HRJ, Ghofrani H. Osteoporosis among asthmatic patients exposed to mustard gas compared with non-exposed asthmatics. *Tanaffos* 2004; 3: 7-11.
- [21] Shuster S. Osteoporosis, a unitary hypothesis of collagen loss in skin and bone. *Med Hypotheses* 2005; 65: 426-432.
- [22] Laurent G. Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax* 1986; 41: 418-428.

علتی برای ایجاد امراض ریوی بلندمدت تولید شده در این بیماران باشد.

به طور خلاصه می توان گفت، پروفایل متابولیتی سرم بیماران شیمیایی در دو سطح از آسیب ریوی با استفاده از NMR دارای مسیرهای متابولیتی کاملاً متفاوتی با هم بودند. مهم ترین پروسه بیولوژی اکسیداسیون اسیدهای چرب بود که در گروه نرمال شیمیایی β -اکسیداسیون اسیدهای چرب نسبت به گروه شیمیایی با آسیب ریوی شدید کاهش یافته است. بر این اساس می توان گفت که دو گروه به هم تبدیل نمی شوند چنان که بعد از بیش از ۲۰ سال گروه نرمال شیمیایی هم چنان نرمال باقی مانده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از بیمارانی که در این مطالعه مشارکت نمودند و همچنین از کارمندان محترم بیمارستان ساسان که در جمع آوری نمونه مساعدت لازم را مبذول داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- [1] Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* 2005; 214: 198-209.
- [2] Ghanei M, Harandi AA. Long term consequences from exposure to sulfur mustard: a review. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 451-456.
- [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, Tazelaar HD, Chilosi M, Harandi AA, Peyman M, Akbari HMH, et al. An international collaborative pathologic study of surgical lung biopsies from mustard gas-exposed patients. *Respir Med* 2008; 102: 825-830.
- [5] Freitag L, Firusian N, Stamatis G, Greschuchna D. The role of bronchoscopy in pulmonary complications due to mustard gas inhalation. *Chest* 1991; 100: 1436-1441.
- [6] Bijani K, Moghadamnia A. Long-term effects of chemical weapons on respiratory tract in Iraq-Iran war

Nuclear magnetic resonance -based metabolomics analysis of patients exposed to sulfur mustard in different stages using random forest method

Bibi Fatemeh Nobakht M. Gh. (Ph.D)^{1,3}, Rasoul Aliannejad (M.D)², Afsaneh Arefi Oskouie (Ph.D)³, Fariba Fathi (Ph.D)⁴, Hossein Ali Sahakhah (M.Sc)⁵, Mostafa Rezaei-Tavirani (Ph.D)^{*1}

1 – Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 - Pulmonary Department, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 – Dept. of Basic Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 – Dept. of Chemistry, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

5 – Physiology Research Center and Dept. of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 19 Sep 2015; Accepted: 8 Nov 2015)

Introduction: Metabolomics is a powerful technique for determination of biomarkers. Here, we aimed to determine discriminatory metabolomic profiles in different stages of sulfur mustard-exposed patients (SMEPs).

Materials and methods: Nuclear magnetic resonance spectroscopy was used to analyze serum samples from 17 SMEPs (normal group patients) and 17 SMEPs (severe group patients). Multivariate statistical analysis using random forest (RF) was performed on a 'training set' (70% of the total sample) in order to produce a discriminatory model classifying two groups of patients, and the model tested in the remaining subjects.

Results: A classification model was derived using data from the training set with an area under the receiver operating curve (AUC) of 0.87. In the test set (the remaining 30% of subjects), the AUC was 0.8, thus RF model had good predictive power. We observed significant changes in lipid, amino acids and energy metabolism between two groups of patients.

Conclusion: Nuclear magnetic resonance spectroscopy of serum successfully differentiates two groups of patients exposed to sulfur mustard. This technique has the potential to provide novel diagnostics and identify novel pathophysiological mechanisms, biomarkers and therapeutic targets.

Keywords: Mustard Gas, Serum, Metabolomics

* Corresponding author. Tel: +98 9125709532
tavirany@yahoo.com