

بررسی آنزیم میلوپراکسیداز در نوتروفیل‌های خون محیطی بیماران دیابتی با و بدون عفونت

چکیده

زهرا عبدی لیایی^{۱*}، عبدالرضا سودبخش^۱، لیدا عطارد^۲، غلامرضا توگه^۳، منوچهر نخجوانی^۴، پریسا موسوی پناه^۵، بهادر اشیدری^۵، منوچهر امینی^۶، فریده شاکری راد^۶، سعیده هاشمی حفظ آبادی^۶، شریفه سمیعی کیا^۶

۱- گروه عفونی

۲- گروه اطفال

۳- گروه هماتولوژی

۴- گروه غدد

۵- پزشک عمومی

۶- کارشناس آزمایشگاه خون و غدد،

بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول، تهران، بلوار کشاورز، بیمارستان امام

خمینی، بخش عفونی

تلفن: ۶۶۹۲۹۲۱۶

email: abdolia@sina.tums.ac.ir

زمینه و هدف: میلوپراکسیداز (MPO)، آنزیمی آهن‌دار در گرانول‌های آزرروفیلیک نوتروفیل‌ها است که در عملکرد میکروب‌کشی نقش دارد و باعث تبدیل پراکسید هیدروژن به HOCl می‌شود. با این حال عفونت‌های شدید در کمتر از ۵٪ مبتلایان به کمبود MPO اتفاق می‌افتد که غالباً در یک بیمار دیابتی است. در این طرح، بیماران دیابتی عفونت‌دار را از لحاظ احتمال نقص آنزیمی فوق با دیابتی‌های بدون عفونت مقایسه نمودیم، تا ببینیم شیوع نقص میلوپراکسیداز در بیماران دیابتی که دچار عفونت شده بودند بیشتر است یا خیر و در صورتی که عفونت در بیماران فوق شایع‌تر باشد، این عفونت‌ها کدامند؟ **روش بررسی:** در یک مطالعه case-control، ۱۰۰ بیمار دیابتی در بیمارستان امام در سال‌های ۸۴ و ۸۵ که حائز شرایط بودند، در دو گروه بررسی و اطلاعات مصاحبه، پرونده و آزمایشگاه ارزیابی گردید. **یافته‌ها:** علی‌رغم اختلاف لام‌ها در شدت رنگ‌پذیری، آنزیم MPO در ۱۰۰٪ بیماران مثبت بود و اختلافی بین دو گروه مشاهده نشد. میانگین سنی و مدت ابتلا به دیابت در گروه هدف بیشتر بود. در ارتباط با جنسیت، نوع دیابت و میزان HbA1c، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت. BMI و PMN در گروه هدف بالاتر بود. شایع‌ترین عفونت‌ها در گروه هدف به ترتیب: عفونت‌های بافت نرم، استخوان و مفاصل، TB، پنومونی و ادراری بود. **نتیجه‌گیری:** بررسی ارتباط نقص MPO با عفونت امکان‌پذیر نبوده و انجام مطالعات به روش کمی جهت بررسی شیوع این اختلال در ایران پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: میلوپراکسیداز، دیابت قندی، هموگلوبین گلیکوزیله خون.

مقدمه

میلوپراکسیداز (MPO)، Myeloperoxidase، آنزیمی آهن‌دار در گرانول‌های آزرروفیلیک نوتروفیل‌ها است و به میزان ۰/۳۳ آنچه که در سلول‌های پلی‌مرفونوکلتر (PMN) Polymorphonuclear cells دیده می‌شود، در لیزوزوم‌های منوسیتی یافت می‌شود. این آنزیم اولین بار در سال ۱۹۴۱ جدا گردید و کمبود آن در سال ۱۹۵۴ شرح داده شد. ژن آن در ناحیه ۲۳-۱۷q۲۲ قرار دارد.^۱ پیشتر گمان می‌شد کمبود میلوپراکسیداز یک واقعه نادر باشد، در واقع تا سال ۱۹۷۱ تنها ۱۷ مورد از این بیماری گزارش شده بود.^۲ اما در تحقیقات بعدی مشخص گردید عامل دیگری که علاوه بر ضعف تکنیکی موجب شده بود شیوع بیماری اندک تصور گردد این است که اکثر مبتلایان فاقد علامت بالینی‌اند.^{۳،۴} نقص اولیه میلوپراکسیداز، شایع‌ترین اختلال ارثی نوتروفیل‌ها است.^{۳،۴} شیوع این اختلال در ایالات متحده حدود

قندی دارد.^{۱۲} کمبود MPO همچنین، رابطه قوی با ابتلا به بدخیمی دارد.^{۱۳} و به نظر می‌رسد در آترواسکلروز و بیماری‌های نورولوژیک دژنراتیو نقش داشته باشد.^۱ با توجه به این که سابقه انجام چنین مطالعه‌ای روی بیماران دیابتی در ایران وجود نداشت، بر آن شدیم به بررسی آنزیم MPO در نوتروفیل‌های خون محیطی بیماران دیابتی پرداخته و بیماران دیابتی عفونت‌دار را از لحاظ احتمال نقص آنزیمی فوق با دیابتی‌های بدون عفونت مقایسه کنیم تا شیوع نقص MPO در بیماران دیابتی با عفونت مشخص گردد. در صورتی که عفونت در بیماران فوق شایع‌تر باشد، شناسایی شوند. با توجه به شیوع بالای دیابت در جامعه اندازه‌گیری سطح MPO و تشخیص بیماران می‌تواند به درمان به‌موقع و پیشگیری از عفونت‌های شدید و راجعه در این بیماران کمک کند و از تحمل رنج روحی و هزینه‌های اضافی به بیماران و سیستم‌های خدماتی - بهداشتی جلوگیری به‌عمل آورد.

روش بررسی

این مطالعه به‌صورت case-control انجام شد و جامعه مورد مطالعه را بیماران دیابتی مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) در خلال سال‌های ۸۴ و ۸۵ تشکیل می‌دادند. انتخاب نمونه‌ها به‌صورت غیرتصادفی (Non-probability) ساده صورت گرفت. معیارهای ورود به مطالعه در گروه هدف، بیماران دیابتی بستری شده در بخش عفونی بیمارستان امام طی دوره زمانی فوق که وجود عفونت در آنان اثبات شده باشد و در گروه کنترل، بیماران دیابتی مراجعه‌کننده به درمانگاه غدد بیمارستان امام خمینی در همان زمان بودند. در این مطالعه کلیه بیماران دیابتی که سابقه ی نفروپاتی یا BUN و کراتینین بالا داشتند و بیماران شناخته شده با سابقه بیماری‌های مزمن ریوی، سرطان، نوتروپنی ($PMN < 1500$) هم در گروه هدف و هم کنترل از مطالعه خارج شدند. همچنین در گروه کنترل کلیه بیمارانی که سابقه ابتلا به عفونت، طی شش ماه اخیر را داشتند از مطالعه خارج شدند. نمونه خون وریدی، تهیه لام و رنگ‌آمیزی آن به روش Kaplow برای بررسی MPO، پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران حائز شرایطی که حاضر به شرکت در این طرح بودند، ابتدا پرسشنامه‌ای از طریق مصاحبه و پرونده تکمیل می‌شد و سپس نمونه خون وریدی معادل ۱/۵ ml از آنها گرفته می‌شد. ۱ ml از نمونه فوق در لوله مخصوص جهت بررسی از لحاظ HbA1c به

یافته‌ها

مجموعاً ۱۰۰ بیمار دیابتی ارزیابی و موردی از نقص آنزیم یافت نشد. متوسط سن در گروه هدف، $58/74 \pm 1/97$ و در گروه کنترل، $51/63 \pm 1/69$ بود. مردان، ۳۵ نفر (۳۵٪ موارد) و زنان، ۶۵ نفر (۶۵٪) از کل جمعیت مورد مطالعه را تشکیل می‌دادند. مردان در گروه هدف، ۲۰ نفر (۴۰٪) از حجم نمونه گروه هدف) و تعداد زنان در همین گروه، ۳۰ نفر (۶۰٪) از موارد گروه هدف) بود. در گروه کنترل، مردان ۱۵ نفر (۳۰٪) از حجم گروه کنترل) و زنان ۳۵ نفر (۷۰٪ موارد

Artani (دانشگاه Yokohama-1998)، به صورت Invivo مورد بررسی قرار گرفت به این صورت که تعدادی mice را دچار موتاسیون ژنتیکی در ژن مربوط به MPO نمودند و سپس آنها را در سه دسته هموزیگوت (-/-) از لحاظ نقص آنزیم، هتروزیگوت (+/-) و کنترل (+/+) سالم) مورد ارزیابی قرار دادند. Mice ها از نظر رشد، تکامل و fertility نرمال بودند. سپس آنها را در مواجهه با استف اورئوس (تزریق اینتراپریتونال) و کاندیدا آلیکنس (اینتراتراکتال) قرار دادند که در مورد استف، سرعت killing کاهش داشت اما در نهایت میزان killing فرقی با mice های سالم نداشت. ولی در مورد کاندیدا، در mice های هتروزیگوت که تنها ۰/۵ فعالیت آنزیمی را داشتند، در بیوپسی ریه و ارزیابی تنها تاخیر در killing نسبت عکس داشت. در مورد MPO هم، عملکرد آنزیم در بیماران دیابتی کاهش داشت اما این کاهش با سطح HbA1c ارتباط معنی داری نداشت.^۹ در مطالعه Tonis ۱۹۹۷، نیز چهار بیمار دیابتی مبتلا به عفونت‌های پریدونتال با چهار فرد سالم مقایسه شدند که کاهش فعالیت PMN ها را در بیماران دیابتی، مربوط به glycate شدن پروتئین‌های نوتروفیل‌ها مثل NADPH OXIDASE و MPO مربوط دانسته بودند.^{۱۰} هدف اصلی در این طرح، آن بود که ببینیم آیا شیوع کمبود میلوپراکسیداز در بیماران دیابتی که دچار عفونت شده بودند بیشتر است یا خیر و نیز در صورتی که عفونت در بیماران فوق شایع تر باشد این عفونت‌ها کدامند؟ ما موردی مبنی بر نقص آنزیم میلوپراکسیداز یافت نکردیم از اینرو با استفاده از این مطالعه نمی‌توان در مورد ارتباط نقص میلوپراکسیداز با

کنترل) را تشکیل می‌دادند. در گروه هدف، پنج نفر (۱۰٪ موارد گروه هدف) مبتلا به دیابت تیپ یک و ۴۵ نفر (۹۰٪) مبتلا به دیابت تیپ دو بودند و در گروه کنترل، چهار نفر (۸٪ موارد) را بیماران تیپ یک و ۴۲ نفر (۹۲٪ از حجم نمونه گروه کنترل) را بیماران تیپ دو شامل می‌شدند. میانگین مدت ابتلا به دیابت، در گروه هدف، $11/05 \pm 1/28$ و در گروه کنترل، $6/52 \pm 0/71$ بود. میانگین HbA1c، در گروه هدف، $9/64 \pm 0/39$ و در گروه کنترل، $9/00 \pm 0/35$ بود. میانگین شمارش نوتروفیل (PMN)، در گروه هدف، $8221/29 \pm 576/62$ و در گروه کنترل، $6347/98 \pm 206/17$ بود. در این مطالعه، شایع‌ترین عفونت در بیماران گروه هدف، عبارت بود از عفونت‌های پوست و بافت نرم و عفونت‌های استخوان و مفاصل (جدول ۱).

بحث

طبق مطالعه مروری Javed Sheikh، به نظر می‌رسد نقص MPO به تنهایی در کمتر از ۵٪ مبتلایان، منجر به عفونت‌های شدید می‌شود که معمولاً یک عفونت قارچی و در بیماری است که همزمان DM دارد.^۱ همچنین، در مطالعه Hampton ذکر شده که در بیماران MPO deficient و یا در صورت مهار آنزیم میلوپراکسیداز، فعالیت میکروب‌کشی آهسته‌تر می‌شود و نشان داده شد که سرعت Killing، حدود ۸۰٪ کاهش یافته ولی در نهایت از طریق مکانیسم‌های جبرانی به حد نرمال می‌رسد. اما در بررسی‌های *in vitro* این نوتروفیل‌ها از کشتن کاندیدا و اسپرزیلوس ناتوان بودند.^۳ این مطلب در مطالعه

جدول ۱- فراوانی عفونت‌ها در گروه هدف با تفکیک سن و جنس

نوع عفونت	شیوع	درصد	میانگین سنی (سال)	مرد	زن
عفونت‌های پوست و بافت نرم (سلولیت و آبسه)	۱۶	۳۲٪	۵۴/۰۶	۷	۹
عفونت‌های استخوان و مفاصل (استئومیلیت، آرتریت حاد و مزمن)	۱۰	۲۰٪	۶۱/۰۰	۶	۴
سل و عفونت‌های مزمن تنفسی	۷	۱۴٪	۵۴/۱۴	۲	۵
عفونت‌های حاد دستگاه تنفسی (پنومونی)	۵	۱۰٪	۷۴/۲۰	۲	۳
عفونت‌های دستگاه ادراری	۵	۱۰٪	۶۶/۸۰	۰	۵
عفونت‌های دستگاه عصبی مرکزی (مننژیت چرکی، آبسه و انسفالیت)	۲	۴٪	۶۳/۵۰	۱	۱
عفونت‌های گوارشی و داخل شکمی	۲	۴٪	۴۸/۵۰	۱	۱
موکورمایکوزیس	۲	۴٪	۴۹/۰۰	۱	۱
سپسیس	۱	۲٪	۵۶/۰۰	۰	۱
مجموع	۵۰	۱۰۰٪	۵۸/۷۴	۲۰	۳۰

تفاوت رنگ‌پذیری را صرفاً مربوط به خطای رنگ‌آمیزی دانست. ما این تفاوت را ناشی از این می‌دانیم اگرچه آنزیم MPO در تمام بیماران ما موجود بود اما میزان فعالیت در بیماران مختلف، متفاوت بود. ذکر این نکته نیز ضروری است که طبق آنچه از مطالعات گوناگون به‌دست می‌آید، نقص آنزیم MPO تنها شامل فقدان کامل آنزیم نمی‌شود و شامل فقدان آنزیم، نقائص ساختمانی و فقدان عملکرد آن است. در اکثر مطالعاتی که مثل مطالعه Uchimura با تعداد کمتر (۲۵ بیمار دیابتی)، نقص آنزیم یافت شده از روش‌های دقیق مثل فلوسیتومتری، اسپکتوفتومتری و غیره استفاده شده و ناگفته پیداست که یک تست کیفی، هر چقدر هم دقیق باشد، هرگز کیفیت تست‌های کمی را ندارد. بر اساس این مطالعه، میانگین سنی و مدت ابتلا به دیابت در گروه هدف بیشتر از گروه شاهد بود که نشان می‌دهد احتمال بروز عفونت با افزایش سن و مدت ابتلا به دیابت، افزایش می‌یابد. تعداد نوتروفیل‌ها در گروه هدف بالاتر بوده که به دلیل ابتلا به عفونت می‌باشد. میزان HbA1c نیز در بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری نداشته؛ از آنجا که انتظار داشتیم کنترل قند خون در بیماران گروه هدف ضعیف‌تر و HbA1c در آنان بالاتر باشد؛ یافته فوق احتمالاً ناشی از عدم کنترل صحیح قند خون در تعداد زیادی از بیماران گروه شاهد (دلایلی نظیر نمونه‌گیری در اولین نوبت مراجعه بیمار، عدم مصرف صحیح دارو و مانند آن) می‌باشد. طبق مطالعه ما، رابطه‌ای بین نوع دیابت و شیوع بیشتر عفونت وجود نداشت.

References

1. Sheikh J, Park CL, Konop R, Valacer DJ, Pallares D, Ballow M. Myeloperoxidase deficiency. *Emedicine* 2004; 26; 1-11.
2. Lanza F: Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med* 1998; 76: 676-81.
3. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007-17.
4. Chiang AK, Chan GC, Ma SK, Ng YK, Ha SY, Lau YL. Disseminated fungal infection associated with myeloperoxidase deficiency in a premature neonate. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 1027-9.
5. Barnett PS, Braunstein GD. Diabetes Mellitus. In: Andreoli TE, Carpenter CC, Griggs RC, Loscalzo J, editors. *Cecil Essentials of Medicine*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004; p. 621-38.
6. Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341: 1906-12.
7. Uzel G, Holland SM. Phagocyte deficiencies. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW, editors. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 2nd ed. England: Mosby; 2001; p. 4-37.
8. Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 1999; 67: 1828-36.
9. Uchimura K, Nagasaka A, Hayashi R, Makino M, Nagata M, Kakizawa H, et al. Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1999; 13: 264-70.
10. De Toni S, Piva E, Lapolla A, Fontana G, Fedele D, Plebani M. Respiratory burst of neutrophils in diabetic patients with periodontal disease. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 832: 363-7.

بروز عفونت اظهار نظر نمود و یا در مورد رابطه آن با سن، نوع دیابت، طول مدت ابتلا به دیابت و تحت کنترل بودن قند خون بیماران (سطح HbA1c) اظهار نظر نمود. این مساله می‌تواند ناشی از علل زیر باشد: تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای در ارتباط با MPO و تبعات کمبود آن در ایران انجام نشده و اطلاعاتی از آمار مبتلایان ایرانی و مشکلات آنان در دسترس نمی‌باشد. ما برای این منظور با رعایت معیارهای ورود و خروج، ۵۰ نفر به عنوان گروه هدف و به همین تعداد نیز برای گروه کنترل (جمعاً ۱۰۰ نفر) انتخاب کردیم. با در نظر گرفتن تفاوت زیاد آمار شیوع این نقص آنزیمی در مقالات گوناگون، این تعداد نمونه با در نظر گرفتن شیوع ۱ نفر در هر ۴۰۰۰ نفر که در تعداد بیشتری از مقالات دیده شد و با استفاده از فرمول مربوط به مطالعات case-control به‌دست آمد و اگرچه همانطور که گفتیم شیوع این اختلال در ایران مشخص نیست، بعید به‌نظر می‌رسد که نبود نمونه MPO deficient در بین بیماران ما ناشی از اشتباه در تخمین حجم نمونه باشد. پس از نمونه‌گیری، لام‌های تهیه شده، به روش Kaplow (تنها روشی که در اختیار بود) رنگ‌آمیزی و به‌طریق کیفی ارزیابی شد. لام‌های بیماران ما بر حسب شدت رنگ‌پذیری به سه دسته (خوب، متوسط، ضعیف) تقسیم می‌شدند. اگرچه در هیچ تحقیق و مطالعه‌ای نمی‌توان منکر خطاهای انسانی و آزمایشگاهی شد و آنرا را صفر دانست، از آنجا که رنگ‌آمیزی لام‌ها توسط یک نفر و از ابتدای طرح تا انتها توسط یک محلول انجام شده بود نمی‌توان این

Myeloperoxidase deficiency in neutrophils of diabetic patients with and without infectious diseases

Abdi Liaie Z.^{*1}
Soudbakhsh A.¹
Atarod L.²
Toogeh Gh.³
Nakhjavani M.⁴
Mousavipanah P.⁵
Ashidari B.⁵

1- Department of Infectious Diseases
2- Department of Pediatric
3- Department of Hematology
4- Department of Endocrine & Metabolism
5- General Practitioner

Tehran University of Medical Sciences

Abstract

Background: Myeloperoxidase (MPO), an iron-containing protein, is found in the azurophilic granules of neutrophils (PMNs), and catalyzes the conversion of hydrogen peroxide and chloride ions (Cl) into hypochlorous acid, which plays an important role in oxygen-dependent bacterial killing. The enzyme was first isolated in 1941, and deficiency of MPO was first described in 1954. Fewer than 5% of patients with MPO deficiency contract severe infections, which are usually fungal infections in diabetes mellitus (DM) patients. Besides the disorder in antifungal activity, diminished rate of bacterial (*S. aureus*) killing, and carcinogenesis, it seems that MPO deficiency is also related to atherosclerosis, degenerative neurologic diseases, as well as other disorders. In this study, we compared the levels of the MPO enzyme in the peripheral neutrophils of infected and non-infected DM patients at Imam Khomeini Hospital during 2005-2006. We compared these two groups the prevalence of MPO deficiency in each group, in order to then determine any correlations this may have with infection.

Methods: In this case-control study, 50 patients were in the infected group (case group) and 50 were in the control group. Patients were chosen using simple sampling methods. Data was gathered from blood samples, using a qualitative test to determine MPO deficiency (Kaplow stain), laboratory results (BUN, Cr, PMN, HbA1c), interviews and completion of a questionnaires, as well as hospital records. Data were analyzed with SPSS software using T test and chi-square test, with a confidence index of 0.05.

Results: In spite of differences seen in stained slides, the MPO enzyme was positive in all of the patients, and no differences were seen between the two groups.

The average patient age and the duration of DM in the case group were more than those of the control group. No statistical differences in the type of DM and glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels were found between the two groups. Body mass indexes (BMI) and PMN counts were higher in the case group. The most prevalent infections were in the skin and soft tissue, bones and joints, as well as chronic respiratory infections (TB), pneumonia, urinary infections, CNS infections, gastrointestinal and intra-abdominal infections, mucormycosis, and sepsis.

Conclusions: We found no correlation between MPO enzyme deficiency and age, sex, type or duration of DM, HbA1c levels and BMI.

Keywords: MPO: myeloperoxidase, DM, diabetes mellitus, HbA1c: glycosylated hemoglobin

*corresponding author : department of infectious diseases , Imam khomeni hospital , Keshavarz BLVD , Tehran
Tel : +98-21-66929216
email : abdolia@sina.tums.ac.ir