



مقاله های پژوهشی

- ۲۰۰۶ پلی مورفیسم تکرار GGC در ژن eRF3/GSPT1 و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان کولورکتال
 زهرا یوسف زاده، دکتر منوچهر توسلی، دکتر سیمین همتی، فروزان صفری
- ۲۰۱۵ بررسی سطح ویتامین D در آخر سه ماهه اول بارداری و ارتباط آن با آنمی، واژینوز باکتریال و دندان درد در مادران باردار
 دکتر سهیلا ریاحی نژاد، دکتر هتاو قاسمی تهرانی، الهام عالی پور هفشجانی، مژده قاسمی، فرشاد نوری زاده دهکردی
- ۲۰۲۵ بررسی ارتباط بین خونریزی مغزی و بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۲ (MMP-2,9) در بیماران مبتلا به نقص شدید عامل انعقادی XIII
 دکتر مجید نادری، محمدرضا یونسی، اکبر درگلاله، دکتر شعبان علیزاده، دکتر احمد کاظمی، شادی طبیبیان، زهرا کاشانی خطیب
- ۲۰۳۵ بررسی تأثیر miR-372 بر ناپایداری ژنومی در ردهی سرطان معده انسانی MKN-45
 ثریا قاسمی، دکتر حسین مزدارانی، دکتر مسعود سلیمانی

مقاله باز آموزی

- ۲۰۴۸ راهکار طبابت بالینی پرتودرمانی (رادپوتراپی) در سرطان پستان
 دکتر شادی بابازاده، دکتر فریبرز مکاریان، دکتر حمید امامی، دکتر نادیا نجفی زاده، دکتر حمیرا حاج احمدیان، دکتر علیرضا عموحیدری، دکتر مهناز رعایایی، دکتر مریم طباطبائی، دکتر مهتری فقیهی، دکتر مهدی تذهیبی، دکتر الهام معظم، دکتر مهتری سیروس

Original Articles

- The Study of GGC Repeat Polymorphism in Exon 1 of GSPT1/eRF3 Gene and its Association with the Risk of Colorectal Cancer 2014
 Zahra Usefzadeh, Manoochehr Tavassoli PhD, Simin Hemati MD, Forouzan Safari
- Valuation of Vitamin D Level at the End of First Trimester and its Relation with Anemia, Bacterial Vaginosis, and Toothache in Pregnant Mothers 2024
 Soheyla Riahinejad MD, Hatav Ghasemi-Tehrani MD, Elham Alipour-Hafshejani, Mojdeh Ghasemi, Farshad Nourizadeh-Dehkordi
- Relationship between the Matrix Metalloproteinases and the Occurrence of Central Nervous System Bleeding in Factor XIII Deficiency 2034
 Majid Naderi MD, Mohammad Reza Younesi MSc, Akbar Dorgalaleh MSc, Shaban Alizadeh PhD, Ahmad Kazemi PhD, Shadi Tabibian MSc, Zahra Kashani-Khatib MSc
- The Effect of miR-372 on Genome Instability in MKN-45 Cell Line 2047
 Sorayya Ghasemi MSc, Hossein Mozdarani PhD, Masoud Soleimani PhD
- Continuous Medical Education**
- Clinical Guideline: Radiotherapy in Breast Cancer 2058
 Shadi Babazadeh MD, Fariborz Mokarian MD, Hamid Emami MD, Nadia Najafizadeh MD, Homeira Hajahmadian MD, Alireza Amuheidari MD, Mahnaz Roayaei MD, Maryam Tabatabaeian MD, Mehri Faghghi MD, Mehdi Tazhibi MD, Elham Moazam MD, Mehri Siros MD



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۳۱۱)، بهمن چهارم دی ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

مدیر مسؤول: دکتر منصور شعله‌ور سردبیر افتخاری: دکتر رویا کلیشادی

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

ناشر:

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

E-mail: publications@mui.ac.ir

دفتر مجله: دانشکده پزشکی صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶

مسئول دفتر: گلناز رجبی

دورنگار: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۲۹۱

تلفن: ۰۳۱۱-۶۶۹۴۷۳۷

E-mail: jims@med.mui.ac.ir

http://www.journals.mui.ac.ir/jims

وب سایت مجله:

امور نشر:

(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)

شرکت فرزانتگان راداندیش

اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵

تلفن و دورنگار: ۰۳۱۱-۶۶۸۶۳۰۲

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

تیراژ: ۵۰۰ نسخه

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

- Scopus
- Chemical Abstracts
- Islamic World Science Citation Center (ISC)
- Academic Search Complete EBSCO Publishing databases
- WHO/EMRO/Index Medicus
- Google Scholar
- Index Copernicus
- Directory of Open Access Journal (DOAJ)
- Index Academicus
- Scientific Information Database (www.sid.ir)
- www.iranmedex.com

کپی‌رایت: چاپ مطالب مندرج در این مجله به شرط ذکر منبع مجله بلامانع است.

تصاویر رنگی مقالات و کلیپ‌های ویدئویی بر روی وب سایت مجله قابل دسترسی می‌باشند

اعضای شورای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان (به ترتیب حروف الفبا)

نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی
۱- دکتر مجتبی ابطحی	دانشیار، متخصص گوش و حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دکتر ابراهیم اسفندیاری	استاد، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دکتر محمد اسماعیل اکبری	استاد، فوق تخصص جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دکتر فرامرز اسماعیل بیگی	استاد، متخصص داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، آمریکا
۵- دکتر افسون امامی	دانشیار، فوق تخصص نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- شاهین امامی	گروه بیوشیمی و غدد داخلی، بیمارستان سن آنتونیو، فرانسه
۷- دکتر علیرضا امامی	دانشیار، متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۸- دکتر بابک امرا	استاد، فوق تخصص ریه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۹- دکتر رضا امین	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۱۰- دکتر کن باست	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۱۱- دکتر رضا باقریان سرارودی	استادیار، متخصص روانشناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۲- دکتر مجید برکتین	دانشیار، متخصص روانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۳- فرزین پور فرزاد	گروه زیست‌شناسی سلولی و ژنتیک، دانشگاه اراسموس، روتردام، هلند
۱۴- دکتر مسعود پورمقدس	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۵- دکتر احمد چیت‌ساز	دانشیار، متخصص داخلی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۶- دکتر مینا حسن رضایی	متخصص نوروایمونولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، آمریکا
۱۷- دکتر سید مرتضی حیدری	دانشیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۸- دکتر بهناز خانی	دانشیار، متخصص زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۹- دکتر مجید خزاعی	دانشیار، متخصص فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۰- دکتر حسن رزمجو	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۱- دکتر رضا روزبهانی	استادیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۲- دکتر مسعود سهیلیان	استاد، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲۳- دکتر منصور شعله‌ور	دانشیار، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۴- دکتر محمدرضا صفوی	استادیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۵- دکتر خسرو عادل‌لی	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۲۶- دکتر سعید عندلیب	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لوئیس ویل، آمریکا
۲۷- دکتر غلامرضا عسکری	متخصص بیماری‌های پوستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۸- دکتر زیبا فرج‌زادگان	دانشیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۹- دکتر حمید فشارکی	دانشیار، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۰- دکتر مرجانه فولادی	دکترای پرستاری، دانشگاه فلوریدا، آمریکا
۳۱- دکتر علی قیصری	استاد، فوق تخصص جراحی قلب، کالیفرنیا، آمریکا
۳۲- دکتر منصور کارآموز	استاد، متخصص اورولوژی، کالیفرنیا، آمریکا
۳۳- دکتر رویا کلشادی	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۴- دکتر جعفر گلشاهی	دانشیار، فوق تخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۵- دکتر عزیز گهری	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	دانشیار، فوق تخصص آسیب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	دانشیار، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر هوشنگ معین	استاد، متخصص جراحی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۰- دکتر آتیه مغيثی	استاد، متخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، آمریکا
۴۱- دکتر مجید ملکی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴۲- دکتر محمدرضا نوربخش	دانشیار، متخصص فیزیوتراپی، آمریکا
۴۳- دکتر فریدون نوحی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴۴- دکتر علی محمد هنجنی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

راهنمای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

- ۱- **اهداف و چشم انداز:** مجله دانشکده پزشکی اصفهان به صورت هفته‌نامه و تحت حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتشر می‌گردد.
- ۲- این مجله مقالات اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را منتشر می‌نماید و همچنین فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین را بر روی وب سایت مجله قرار می‌دهد.
- ۳- **پذیرش دست‌نوشته:** پذیرش دست‌نوشته‌ها و پیگیری‌های بعدی در این مجله فقط از طریق وب سایت اختصاصی آن به آدرس <http://www.journals.mui.ac.ir/jims> و پس از ثبت نام (Registration) در آن ممکن می‌باشد. همراه دست‌نوشته باید یک نامه تایپ شده (Covering letter) به سردبیر، شامل عنوان و اسامی نویسنده یا نویسندگان و اعلام این که این دست‌نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است و یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد، ارسال گردد.
- ۴- دست‌نوشته باید توسط نرم‌افزار MS Word در سایز A4 و فاصله خطوط دو برابر (Double Spaced) با حاشیه‌های ۲/۵ سانتی‌متری تهیه شوند. جداول بدون حاشیه خارجی و تصاویر در فرمت GIF و JPEG و در تعداد محدود باشند. ارسال مدارک با فرمت PDF به هیچ عنوان پذیرفته نیست.
- ۵- دست‌نوشته باید شامل صفحه عنوان، چکیده، مقدمه، روش‌ها، یافته‌ها، بحث، تقدیر و تشکر و منابع باشد. **صفحه عنوان:** این صفحه باید شامل عنوان کامل، عنوان مکرری، اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان و همچنین آدرس، تلفن، فاکس و پست الکترونیکی نویسنده مسؤول باشد. ذکر منابع مالی و اعتباری طرح پژوهشی در این صفحه ضروری است.
- ۶- **چکیده:** تمام مقالات اصلی باید دارای چکیده مقاله به دو زبان فارسی و انگلیسی با حداکثر ۲۵۰ کلمه باشد. چکیده باید شامل بخش‌های سابقه علمی موضوع، روش‌ها، یافته‌ها و بحث باشد. در پایان چکیده مقاله ۳-۵ کلمه کلیدی قرار می‌گیرد که تنها با استفاده از راهنمای MESH در آدرس (<http://nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) استخراج گردند.
- ۷- **مقدمه و معرفی:** در این بخش اهداف و علل انجام مطالعه آورده می‌شود؛ بنابراین نیازی به ارائه گسترده مطالب موجود در متون علمی نیست. در این بخش باید از ارائه اطلاعات، یافته‌های و نتایج مطالعه خودداری گردد.
- ۸- **روش‌ها:** این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط منبع آن ذکر گردد اما اگر روشی نوین است، باید به صورتی توضیح داده شود که برای سایر محققان قابل درک و به طور عینی قابل انجام و تکرار باشد. در صورت استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص باید نام، نام کارخانه سازنده و آدرس آن در پرانتز ذکر گردد. اگر از دارو در مطالعه استفاده شده است باید نام ژنریک، دوز و روش مصرف آن آورده شود. در مورد افراد و بیماران تحت مطالعه باید جنس و سن (همراه انحراف معیار) آورده شود. در مورد نرم‌افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد. در صورتی که مطالعه دارای پرسش‌نامه یا چک لیست است، ضمیمه کردن آن لازم است؛ در مورد پرسش‌نامه‌های استاندارد ذکر نام و مرجع آن کافی است.
- ۹- **یافته‌ها:** این بخش به صورت متن همراه با جدول‌ها، شکل‌ها و نمودارها ارائه می‌گردد. محتوای جداول نباید به صورت کامل در متن ارائه شوند، بلکه کافی است با ذکر شماره جدول، شکل و یا نمودار به آنها اشاره شود. جدول‌ها، نمودارها و شکل‌ها هر کدام باید در یک صفحه جداگانه و پس از منابع، در پایان دست‌نوشته آورده شوند. در این بخش فقط یافته‌ها ارائه می‌شود و باید از ذکر دلایل و استدلال‌های مرتبط با آن خودداری گردد.
- ۱۰- **بحث:** در این بخش در ابتدا به یافته‌های مهم اساسی مطالعه و سپس تشابه و تفاوت‌های آن با یافته‌های سایر پژوهشگران در مطالعات مشابه اشاره می‌گردد. ذکر جزئیات کامل یافته‌ها در این بخش لازم نیست. تأکید بر یافته‌های جدید و با اهمیت مطالعه حاضر و دستاوردهای آن در این قسمت ضروری است. ذکر این که فرضیه ارائه شده در مطالعه صحیح یا نادرست بوده، یا این که دلایل کافی برای رد یا قبول آن به دست نیامده است، ضروری می‌باشد. هدف این بخش، ذکر دلیل اصلی انجام تحقیق، تحلیل و تفسیر یافته‌ها و همچنین نتیجه‌گیری کلی (Conclusion) است.

۱۱- **تقدیر و تشکر:** تمام افرادی که به نحوی در انجام مطالعه نقش داشته ولی جزء نویسندگان نبوده‌اند باید در این بخش مورد تقدیر قرار گیرند؛ از جمله کسانی که کمک‌های فنی، نوشتاری و مالی داده و همچنین سرپرستان و مدیران بخش‌های محل انجام مطالعه که در امر پشتیبانی‌های عمومی در اجرای تحقیق فعالیت داشته‌اند.

۱۲- **جدول‌ها:** تعداد محدود جدول با توجه به حجم مطالعه و مقاله، همراه با ذکر عنوان آن در بالای جدول مورد قبول خواهد بود. ارسال جداول فقط تحت نرم‌افزار MSWord مورد قبول است. توضیحات اضافی در خصوص محتوای جداول باید به صورت پی‌نوشته و در پایین جدول باشد. جدول‌ها باید در صفحات جداگانه و در پایان دست نوشته (پس از منابع) قرار داده شوند.

۱۳- **شکل‌ها:** تعداد محدود شکل همراه ذکر عنوان آن در زیر شکل یا نمودار و با فرمت GIF و JPEG قابل قبول است. اطلاعات موجود در شکل‌ها یا نمودارها نباید به طور کاملاً مشابه در جدول‌ها و یا متن مقاله ذکر شده باشند.

۱۴- **منابع:** نویسنده باید از صحت اشاره منابع ذکر شده به مطالب مورد استناد مطمئن باشد. ساختار منابع در این مجله بر اساس *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Bio Medical Journals (ICMJE)* و معاهده ونکوور (Vancouver) می‌باشد. تمامی منابع باید به زبان انگلیسی باشد، ترجمه متن منابع فارسی به عهده نویسنده است و در پایان آن عبارت [Persian] خواهد آمد. موارد ذیل برای نمونه ذکر می‌گردد:

اگر منبع مورد نظر مقاله است:

نام خانوادگی نویسنده، حرف اول نام کوچک نویسنده، عنوان مقاله، مخفف نام مجله (بر اساس Medline)، سال انتشار، شماره‌ی انتشار، شماره‌ی مجله، شماره‌ی صفحات. مثال:

(EN): Inzer N. Treatment of calcific aortic stenosis. Am J Cardiol 1987; 59(6): 314-7.

(FA): Zini F, Basiri Jahromi Sh. Study of fungal infections in patients with leukemia. Iranian journal of public health 1994; 1(4):89-103.[Persian].

(چنانچه تعداد نویسندگان ۶ نفر یا کمتر باشد، ذکر اسامی آن‌ها ضروری است. اگر تعداد آن‌ها ۷ نفر یا بیشتر باشد، پس از ۶ نفر، عبارت "et al." استفاده شود.)

اگر منبع مورد نظر کتاب است:

نام خانوادگی و حرف اول نام کوچک نویسنده (نویسندگان). عنوان کتاب. نوبت چاپ. محل نشر؛ نام ناشر؛ سال انتشار. p. شماره صفحات (نام نویسندگان با علامت کاما از هم جدا شود). مثال:

(EN): Romenes GJ. Cunningham's manual. 15th ed. New York: Oxford Univ Press; 1987.p.43-5.

(FA): Azizi F, Janghorbani M, Hatami H. Epidemiology and control of common disorders in Iran. 2nd ed. Tehran: Eshtiagh Publication; 2000.p.558.[Persian].

اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

نام خانوادگی و حرف اول نام کوچک نویسنده (نویسندگان) آن فصل. عنوان فصل مورد نظر. در: نام خانوادگی و حرف اول نام تدوین کننده‌ی کتاب. عنوان کتاب. نوبت چاپ. محل نشر؛ نام ناشر؛ سال انتشار. p. صفحات. مثال:

(EN): Bodly L, Bailey Jr. Urinary tract infection. In: Tailor R, editor. Family medicine. 6th ed. New York: Springer; 2003.p. 807-13.

۱۵- **نمونه‌خوانی (Proofreading):** یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده مسؤوّل ارسال می‌گردد که لازم است در کوتاه‌ترین زمان تغییرات مورد نظر مجله انجام داده، از طریق وبسایت مجله ارسال نماید.

۱۶- **اختصارات و نشانه‌ها:** تنها از اختصارات و نشانه‌های استاندارد استفاده شود و از ذکر عبارات‌های مخفف در عنوان و خلاصه مقاله خودداری گردد.

۱۷- توضیح کامل در مورد هر کدام از عبارتهای اختصاری برای اولین بار در متن آورده شود، مگر این که مربوط به مقیاس‌ها و مقادیر استاندارد شناخته شده باشد.

۱۸- پس از چاپ، یک نسخه از مجله برای نویسنده مسؤوّل ارسال خواهد شد.

- ۱۹- **ملاحظات اخلاقی:** این ملاحظات باید در بخش روش‌ها اشاره گردند. اخذ رضایت‌نامه از کلیه‌ی افراد بالغ شرکت‌کننده در مطالعه ضروری است و در مورد کودکان و افراد تحت تکفل باید از ولی قانونی آنها اخذ شود. ذکر منبع تأییدکننده‌ی ملاحظات اخلاقی مطالعه لازم است. هنگام استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ذکر رعایت و مقررات استاندارد مربوط لازم است.
- ۲۰- **تداخل منافع (Conflict of Interest):** نویسنده یا نویسندگان باید هر گونه ارتباط مالی مانند دریافت هزینه، حق‌الزحمه، مواد و تجهیزات از دانشگاه‌ها، سازمان‌ها، نهادها، شرکت‌ها و سایر منابع که انتشار یافته‌های مطالعه می‌تواند به آنها سود یا زیان برساند را اعلام نمایند.
- ۲۱- **هزینه چاپ:** هیچ‌گونه هزینه‌ای برای چاپ مقالات در این مجله دریافت نمی‌شود.
- ۲۲- **حق نسخه‌برداری (Copyright):** تمامی محتویات مجله دانشکده پزشکی اصفهان تحت قانون حق نسخه‌برداری بین‌المللی قرار دارد. این مجله برای استفاده غیر تجاری در اختیار افراد قرار می‌گیرد. اصلاح، انتشار، انتقال و نمایش هر گونه محتویات مجله بدون ذکر نام این مجله ممنوع است.
- ۲۳- **فرآیند مرور دقیق (Peer Review):** تمام دست‌نوشته‌ها توسط حداقل ۳ نفر از داوران منتخب شورای نویسندگان مجله مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. نویسنده‌ی مسؤؤل در کوتاه‌ترین زمان در جریان تصمیم‌سردبیر در مورد رد، قبول یا اصلاحات مورد نظر داوران و هیأت تحریریه قرار خواهد گرفت. در صورت پذیرش مقاله برای چاپ، نامه پذیرش به همراه ایمیل برای نویسنده‌ی مسؤؤل ارسال می‌شود و مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت.
- ۲۴- هیأت تحریریه در رد، اصلاح، ویرایش و خلاصه کردن مقاله آزاد است.
- ۲۵- مسؤولیت صحت یا سقم مطالب ارائه شده در مقاله بر عهده‌ی نویسنده یا نویسندگان است.

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

- ۲۰۰۶..... پلی مورفیسم تکرار GGC در ژن eRF3/GSPT1 و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان کولورکتال.....
زهرایوسف‌زاده، دکتر منوچهر توسلی، دکتر سیمین همتی، فروزان صفری
- ۲۰۱۵..... بررسی سطح ویتامین D در آخر سه ماهه‌ی اول بارداری و ارتباط آن با آنمی، واژینوز باکتریال و دندان درد در مادران باردار.....
دکتر سهیلا ریاحی‌نژاد، دکتر هتوا قاسمی‌تهرانی، الهام عالی‌پور هفشجانی، مژده قاسمی، فرشاد نوری‌زاده دهکردی
- ۲۰۲۵..... بررسی ارتباط بین خونریزی مغزی و بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۲ (MMP-2,9) در بیماران مبتلا به نقص شدید عامل انعقادی XIII.....
دکتر مجید نادری، محمدرضا یونسی، اکبر درگل‌اله، دکتر شعبان علیزاده، دکتر احمد کاظمی، شادی طبیبیان، زهرا کاشانی خطیب
- ۲۰۳۵..... بررسی تأثیر miR-۳۷۲ بر ناپایداری ژنومیکی در رده‌ی سرطان معده‌ی انسانی MKN-۴۵.....
ثریا قاسمی، دکتر حسین مزدارانی، دکتر مسعود سلیمانی

مقاله باز آموزی

- ۲۰۴۸..... راهکار طبابت بالینی پرتودرمانی (رادپوتراپی) در سرطان پستان.....
دکتر شادی بابازاده، دکتر فریبرز مکاریان، دکتر حمید امامی، دکتر نادیا نجفی‌زاده، دکتر حمیرا حاج احمدیان، دکتر علیرضا عموحیدری، دکتر مهناز رعایایی، دکتر مریم طباطبائیان، دکتر مهری فقیهی، دکتر مهدی تذهیبی، دکتر الهام معظم، دکتر مهری سیروس

پلی مورفیسم تکرار GGC در ژن eRF3/GSPT1 و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان کولورکتال

زهرا یوسفزاده^۱، دکتر منوچهر توسلی^۲، دکتر سیمین همتی^۳، فروزان صفری^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال، سومین علت مرگ ناشی از سرطان در بین مردان و چهارمین عامل در بین زنان در ایران می‌باشد. پروتئین eRF3/GSPT1 (عامل شماره ۳ ختم ترجمه یوکاریوتی) یک GTPase وابسته به eRF1 است که در یک کمپلکس واسطه سبب پایان ترجمه در یوکاریوت‌ها می‌شود. علاوه بر نقش آن در پایان ترجمه، عامل ختم یوکاریوت شماره ۳ (eRF3) در چندین فرایند سلولی از جمله تنظیم سیکل سلولی و عبور از مرحله G1 به مرحله S در سیکل سلولی، سازمان‌بندی سایتواسکتون، mRNA decay، بازسازی ریبوزم و آپتوز شرکت می‌نماید. شواهد متعددی بر اساس مطالعات پیشین بر روی پلی مورفیسم تکرارهای n (GGC) (پلی‌گلايسين) که بر روی اگزون ۱ ژن eRF3/GSPT1 قرار دارد، از وجود نقش عوامل ترجمه یوکاریوتی در ایجاد سرطان حمایت می‌کنند.

روش‌ها: در این مطالعه، تعداد تکرارهای آللی ریز ماهواره‌ای n (GGC) در ژن eRF3/GSPT1 در ۱۵۳ بیمار با سرطان کولورکتال و ۲۸۰ فرد به عنوان شاهد در جمعیت اصفهان تعیین شد. بسط‌های GGC توسط تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) تکثیر گردید و تعداد تکرار GGC به وسیله الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکرلامید و به وسیله تعیین توالی به دست آمد. آل‌های تعیین توالی شده به عنوان نشانگرهای مخصوص برای تعیین دقیق تعداد تکرارها استفاده شد.

یافته‌ها: چهار طول متفاوت از تکرارهای GGC در محدوده‌های ۱۲، ۱۱، ۱۰ و ۷ تکرار مشاهده شد. بیشترین فراوانی ژنوتیپی در بین افراد شاهد و مورد هموزیگوت‌ها با طول ۱۰ تکرار مشاهده شد. ارتباط مستقیمی بین حضور آلل Gly-۱۲ و خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ مشاهده شد (OR = ۲/۷، P = ۰/۰۴۰۰). همچنین، میان تعداد تکرارهای پلی مورفیسم ژن eRF3/GSPT1 و توارث بیماری ارتباط معنی‌داری مشاهده شد (OR = ۱۰/۷، P = ۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که افراد حامل آلل ۱۲ تکرار در خطر بیشتری برای ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ می‌باشند.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، پلی مورفیسم، عامل ترجمه یوکاریوتی شماره ۳ (eRF3)

ارجاع: یوسفزاده زهرا، توسلی منوچهر، همتی سیمین، صفری فروزان. پلی مورفیسم تکرار GGC در ژن eRF3/GSPT1 و ارتباط آن با

خطر ابتلا به سرطان کولورکتال. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۱): ۲۰۱۴-۲۰۰۶

۱- دانشجو، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه پرتودرمانی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس آزمایشگاه، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

سرطان روده‌ی بزرگ، بیماری است که از سلول‌های اپی‌تلیال مجرای روده سرچشمه می‌گیرد و سبب رشد توده‌ی سرطان در کولون، رکتوم و آپاندیس می‌شود. میزان شیوع این بیماری، ۶۶۵/۰۰۰ مرگ در سراسر جهان در سال می‌باشد (۱). سرطان کولورکتال، یک بیماری کشنده و به نسبت شایع (۵۰۰۰ مورد جدید در سال در ایران) می‌باشد و با توجه به بروز بالای سرطان کولورکتال (۷ در ۱۰۰۰۰۰ نفر) این بیماری سومین علت مرگ ناشی از سرطان در بین مردان و چهارمین عامل در بین زنان در ایران بیان می‌شود (۲). خطر رشد سرطان با افزایش سن افزایش می‌یابد. بیشترین موارد در سن ۶۰-۷۰ سالگی اتفاق می‌افتد. در حالی که موارد قبل از سن ۵۰ سال نادر است؛ مگر آن که سابقه‌ی خانوادگی در بیمار وجود داشته باشد. تغییر در برخی از ژن‌ها خطر ابتلا به سرطان کولورکتال را افزایش می‌دهد از جمله سرطان غیر پلیپوزی ارثی کولورکتال (HNPCC یا Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) و پلی‌پوزیز آدنوماتوز خانوادگی (FAP یا Familial adenomatous polyposis). به علاوه، جهش در سلول‌های جنسی یا سوماتیک در توالی‌های خاصی از DNA از جمله ژن‌های همانندسازی DNA یا ژن‌های ترمیم DNA و یا ژن‌هایی که باعث رشد نامحدود سلول می‌شوند، می‌تواند باعث سرطان روده‌ی بزرگ شود (۳). در پژوهش‌های اخیر مشخص شده است که ژن‌های دخیل در پایان ترجمه نیز می‌توانند باعث ایجاد سرطان شوند (۴).

پایان ترجمه در یوکاریوت‌ها از سه کدان ختم UAG، UGA و UAA که در سایت A ریبوزوم قرار

می‌گیرند و عوامل ختم ترجمه که با eRF1 و eRF2 مشخص می‌شوند، تبعیت می‌کند (۶-۵). عملکرد اصلی eRF1، انتقال سیگنال از زیر واحد کوچک ریبوزوم به زیر واحد بزرگ و به محرک پپتیدیل-tRNA هیدرولایز است (۷).

eRF3 یک GTPase (Guanosine triphosphatase) است که فعالیت آن به طور کامل به ریبوزوم و eRF1 وابسته است (۸). پیشنهاد شده است که eRF3 به باند شدن eRF1 به کدان ختم ریبوزوم شارژ شده کمک می‌کند (۹). در پستانداران دو ژن جدا، eRF3 را کد می‌نمایند که شامل eRF3a/GSPT1 و eRF3b/GSPT2 است. این ژن‌ها برای پروتئین‌های eRF3a و eRF3b کد می‌کنند. مکان این ژن‌ها به ترتیب بر روی کروموزوم‌های p۱۳.۱۱۶ و Xp۱۱.۲۱-۲۳ در انسان می‌باشد (۱۰). هر دو eRF3a و eRF3b می‌توانند به eRF1 باند شوند و فعالیت GTPase داشته باشند (۱۱). مشخص شده است که هر دو پروتئین eRF1 و eRF3 نه تنها با یکدیگر برهمکنش دارند، بلکه با پروتئین‌های دیگر نیز بر همکنش می‌نمایند. مطالعات ارتباط eRF3/GSPT1 را با تنظیم سیکل سلولی و عبور از مرحله‌ی G1 به مرحله‌ی S در سیکل سلولی (۱۲)، سازمان‌بندی سایتواسکلتون (۱۳)، mRNA decay (۱۴-۱۵) (Messenger RNA decay)، بازسازی ریبوزوم، آپوپتوز (۱۶-۱۷) و تومورزایی (۱۲) مشخص کرده‌اند.

دمین N-ترمینال eRF3/GSPT1 شامل یک بسط پلی گلیسین است که به وسیله‌ی تکرارهای n (GGC) در اگزون ۱ ژن eRF3/GSPT1 کد می‌شود (۱۸). اگر طول بسط‌های GGC روی اتصال مؤثر

در استخراج DNA ژنومی از خون، از روش رسوب نمکی استفاده شد. DNA استخراج شده توسط اتانول رسوب و سپس نمکزدایی شد و در نهایت، در محلول TE در دمای 20°C - نگهداری شد. ناحیه ی ژنی مورد نظر (لوکوس GGC) توسط پرایمرهای پیرو ۳' - GTC GCA CCA GTC CTG ۵' - AGG و پیشرو ۳' - CTC TCG TTC CAT TCT GTC CAC - ۵' تکثیر گردید.

واکنش زنجیر پلیمرز در حجم نهایی $25\ \mu\text{l}$ حاوی $200\text{--}100\ \text{ng}$ DNA ژنومی، $200\ \mu\text{M}$ dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates)، $200\ \text{nM}$ از هر یک از پرایمرهای پیشرو و پیرو، $2\ \text{mM}$ MgCl_2 ، $2/5\ \mu\text{l}$ DMSO (Dimethyl sulfoxide) 10% درصد، $5\ \mu\text{l}$ بتائین $5\ \text{M}$ ، $2/5\ \mu\text{l}$ از $10\times$ بافر PCR (Polymerase chain reaction) و $2\ \text{U}$ آنزیم SmarTaq DNA polymerase (شرکت سیناژن تهران) در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف انجام شد. پس از واسرشت شدن اولیه در دمای 94°C به مدت 5 دقیقه، 33 سیکل PCR با دمای 94°C به مدت 1 دقیقه برای واسرشت شدن رشته‌ها، 59°C به مدت 1 دقیقه جهت اتصال پرایمرها و 72°C به مدت 1 دقیقه برای گسترش پرایمرها انجام شد. یک سیکل انتهایی نیز جهت تکثیر توالی‌های ناقص به مدت 10 دقیقه در دمای 72°C در نظر گرفته شد.

شرایط انجام PCR بدین صورت بود: چرخه‌ی اول 94°C به مدت 5 دقیقه، سپس 33 چرخه‌ی 94°C به مدت 1 دقیقه، دمای 60°C به مدت 1 دقیقه، دمای 72°C به مدت 1 دقیقه و در نهایت، یک چرخه‌ی 72°C به مدت 10 دقیقه. آلل‌ها در

عوامل رونویسی یا پروتئین‌های Cis-acting اثر بگذارد، سطح رونویسی با تعداد حضور تکرارهای GGC متناسب خواهد بود. بنابراین، افراد با آلل‌های طولانی‌تر (یا کوتاه‌تر) ممکن است استعداد بیشتر (یا کمتر) برای سرطان داشته باشند. تفاوت در فرکانس آللی بین جمعیت‌های مختلف می‌تواند نشان دهنده‌ی تفاوت استعداد جمعیت برای سرطان باشد (۱۹).

در مطالعات گذشته، بین وجود پلی مورفیسم تکرارهای n (GGC) و ایجاد سرطان‌های معده، پستان و روده‌ی بزرگ ارتباط مستقیمی دیده شد. بنابراین نقش مهمی برای این عامل تنظیم کننده‌ی ترجمه در بالا بردن خطر سرطان شناخته شده است (۱۹-۲۰). هدف از این مطالعه، بررسی تعداد تکرارهای آللی ریز ماهواره‌ی n (GGC) در ژن eRF3/GSPT1 در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و افراد سالم به عنوان شاهد در جمعیت اصفهان و ارتباط بین خطر ابتلا به سرطان کولورکتال و طول تکرارهای پلی مورفیسم n (GGC) بود. این امر می‌تواند در شناسایی افراد مستعد به سرطان کولورکتال کمک نماید.

روش‌ها

نمونه‌ی خون از 153 فرد مبتلا به سرطان کولورکتال (۸۵ مرد و ۶۸ زن) و 280 فرد سالم در محدوده‌ی سنی $30\text{--}90$ سال در واحد نمونه‌گیری بیمارستان سیدالشهدا (ع) شهر اصفهان با رضایت بیماران گرفته شد. جهت جمع‌آوری اطلاعات بالینی و انجام مطالعات آماری، فرم‌های پرسش‌نامه طراحی شد که حاوی اطلاعاتی از جمله شماره‌ی پرونده، سن فرد، سوابق خانوادگی ابتلا به سرطان و درجه‌ی پیشرفت بیماری می‌شد.

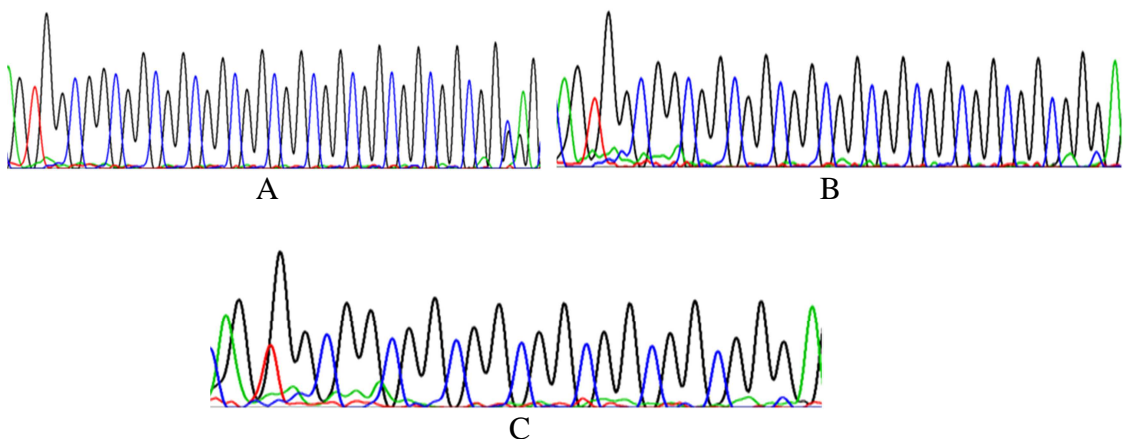
در این مطالعه، ۴ آلل مختلف برای اگزون شماره ۱ ژن ۱ eRF3/GSPT۱ در محدوده ۱۲-۷ تکرار در افراد شاهد و مورد (مبتلایان به سرطان کولورکتال) تشخیص داده شد. از بین این آلل‌ها، آلل ۱۰ تکرار بیشترین فراوانی را در بین افراد مورد (۶۸/۳۰ درصد) و شاهد (۶۷/۹۰ درصد) داشت. دومین فراوانی آلل در بین افراد مورد و شاهد، آلل ۱۱ تکرار با فراوانی به ترتیب ۲۴/۱۸ درصد و ۲۵/۳۰ درصد مشاهده شد. آلل ۱۲ تکرار کمترین فراوانی را در بین افراد شاهد (۱/۳۰ درصد) و مورد (۳/۲۷ درصد) دارا بود. در جدول ۱ فراوانی آلل‌ها در بین افراد مورد مطالعه برای ژن ۱ eRF3/GSPT۱ آمده است.

همان‌طور که در جدول ۱ مشخص شده است، توزیع آلل ۱۲ تکرار در بین دو گروه مورد و شاهد یکسان نیست. این نتایج نشان داد که افراد حامل این آلل، بیشتر در خطر ابتلا به سرطان کولورکتال نسبت به جمعیت شاهد می‌باشند. صحت این مطلب با انجام آزمون‌های آماری تأیید شد ($OR = ۲/۷$ و $P = ۰/۰۴۰۰$).

اندازه‌های مختلف با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد جدا شدند و پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، نتایج توسط اسکنر ثبت گردید. سپس آلل‌ها در اندازه‌های مختلف جهت انجام تعیین توالی انتخاب شدند. این آلل‌های تعیین توالی شده، سپس به عنوان نشانگرهای اختصاصی برای تعیین دقیق تعداد تکرارهای GGC در نمونه‌های دیگر مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). پس از به دست آوردن تعداد تکرارهای GGC در افراد مورد و شاهد، فراوانی هر کدام از تکرارهای GGC با استفاده از سرویس اینترنتی SISA (<http://home.clera.net/sisa/>) محاسبه شد. ارتباط این تکرارها با بروز سرطان پستان در جمعیت به کمک آزمون‌های χ^2 و نسبت افزایش OR (یا Odd ratio) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

برای تعیین دقیق تعداد تکرارهای GGC واقع بر روی ژن ۱ eRF3/GSPT۱ بررسی‌های محصول PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد انجام شد (شکل ۲).



شکل ۱. کروماتوگرام نتایج حاصل از تعیین توالی هر یک از نشانگرهای آللی ژن ۱ eRF3/GSPT۱ (A دارای دو آلل ۱۰ تکرار، B دارای دو آلل ۱۱ و ۱۲ تکرار، C دارای دو آلل ۷ تکرار)

جدول ۱. فراوانی آللی و Odds ratio تکرارهای GGC در آگزون شماره ۱ ژن ۱ eRF3/GSPT۱ در افراد شاهد و مورد

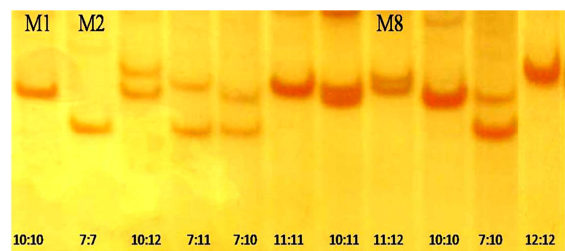
مقدار P	٪۹۵ CI	OR	تعداد آلل‌ها		تعداد تکرارهای GGC
			مورد تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	
۰/۴۱	(۰/۳۹-۱/۴۷)	۰/۷	۴/۲ (۴/۲)	۳۱ (۵/۵)	۷ (GGC)
۱/۰۰	(۰/۷۶-۱/۳۷)	۱/۰	۲۰۹ (۶۸/۳)	۳۸۰ (۶۷/۹)	۱۰ (GGC)
۰/۷۰	(۰/۶۸-۱/۳۰)	۰/۹	۷۴ (۲۴/۲)	۱۴۲ (۲۵/۳)	۱۱ (GGC)
۰/۰۴	(۱/۰۱-۷/۰۸)	۲/۷	۱۰ (۳/۳)	۷ (۱/۳)	۱۲ (GGC)
۰/۴۱			۳۰۶ (۱۰۰)	۵۶۰ (۱۰۰)	مجموع

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی و Odds ratio تکرارهای GGC در آگزون شماره ۱ ژن ۱ eRF3/GSPT۱ در افراد شاهد و مورد

مقدار P	OR	٪۹۵ CI	تعداد ژنوتیپ‌ها		تعداد ژنوتیپ‌های GGC
			مورد تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	
۰/۶۶	۱/۸۳	(۰/۱۱-۲۹/۵۰)	۱ (۰/۶)	۱ (۰/۳)	۷/۷
۰/۵۲	۰/۷۶	(۰/۷۶-۱/۷۷)	۸ (۵/۲)	۱۹ (۶/۸)	۷/۱۰
۰/۳۵	۰/۵۴	(۰/۱۵-۱/۹۹)	۳ (۱/۹)	۱۰ (۳/۶)	۷/۱۱
۰/۷۰	۱/۰۸	(۰/۷۳-۱/۶۰)	۷۴ (۴۸/۴)	۱۳۰ (۴۶/۴)	۱۰/۱۰
۰/۵۹	۰/۸۹	(۰/۵۸-۰/۳۶)	۴۸ (۳۱/۴)	۹۵ (۳۳/۹)	۱۰/۱۱
۰/۴۸	۱/۵۴	(۰/۴۶-۵/۱۴)	۵ (۳/۳)	۶ (۲/۱)	۱۰/۱۲
۰/۹۶	۱/۰۲	(۰/۴۶-۲/۲۶)	۱۰ (۶/۵)	۱۸ (۶/۴)	۱۱/۱۱
۰/۱۰	۵/۴۸	(۰/۵۶-۵۳/۱۴)	۳ (۱/۹)	۱ (۰/۳)	۱۱/۱۲
			۱ (۰/۶)	۰ (۰)	۱۲/۱۲

۴۶/۴۰ درصد) مربوط به ژنوتیپ ۱۰/۱۰ بود (جدول ۲). اختلاف معنی‌داری بین مجموع ژنوتیپ‌های ۱۱/۱۲ و ۱۲/۱۲ مشاهده شد (OR = ۷/۵ و P = ۰/۰۳۰۰). (جدول ۳).

در این مطالعه، میان تعداد تکرارهای پلی مورفیسیم ژن ۱ eRF3/GSPT۱ و توارث بیماری نیز یک ارتباط قوی مشاهده شد (P = ۰/۰۰۰۱ و OR = ۱۰/۷۵)؛ به طوری که افرادی که دارای سابقه‌ی سرطان کولورکتال در خویشان نزدیک و حامل آلل ۱۲ تکرار GGC بودند، ۱۰ مرتبه بیشتر در خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ بودند (جدول ۴).



شکل ۲. ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد جهت بررسی پلی مورفیسیم تکرارهای n (GGC) در آگزون شماره ۱ ژن ۱ eRF3/GSPT۱. علاوه بر نشانگر ۱۰۰ جفت بازی از نمونه‌های M1 و M2، M8 بعد از تعیین توالی به عنوان نشانگرهای مخصوص آلل استفاده شد.

همچنین ۹ ترکیب ژنوتیپی مختلف در بین افراد مورد مطالعه مشاهده شد که بیشترین فراوانی در بین افراد مورد (۴۸/۴۰ درصد) و افراد شاهد

جدول ۳. ارتباط بین ژنوتیپ‌های ۱۱/۱۲ و ۱۲/۱۲ تکرار GGC و خطر ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ

ژنوتیپ	گروه		مقدار P	OR (95% CI)
	شاهد تعداد (درصد)	مورد تعداد (درصد)		
۱۱/۱۲ + ۱۲/۱۲	۱ (۰/۳)	۴ (۲/۵)	۰/۰۳۰۰	۷/۵

جدول ۴. ارتباط بین آلل ۱۲ تکرار GGC و سابقه‌ی فامیلی ابتلا به سرطان روده‌ی بزرگ

بیماران	تعداد تکرارهای GGC		مقدار P	OR (95% CI)
	بدون آلل ۱۲ تکرار تعداد (درصد)	با آلل ۱۲ تکرار تعداد (درصد)		
با سابقه‌ی فامیلی	۴ (۴۴/۴)	۵ (۵۵/۶)	۰/۰۰۰۱	۱۰/۷ (۲/۶-۴۴/۱)
بدون سابقه‌ی فامیلی	۱۲۸ (۸۹/۵)	۱۵ (۱۰/۵)		

از ذهن نیست. مسیر پاتوژنیک مولکولی که در این مورد منجر به بروز فنوتیپ سرطانی می‌شود، هنوز مشخص نیست؛ اما می‌تواند به علت ایجاد اثر عملکردی غالب، در نتیجه‌ی تغییر ساختمان سه بعدی پروتئین باشد که این تغییر ساختمانی، عملکرد پروتئین را تغییر می‌دهد. این مسأله می‌تواند بر وظایف eRF3 در تنظیم ترجمه، سازمان‌دهی سایتواسکتون، جداسازی کروموزومی و سیتوکینز یا آپوپتوز اثرگذار باشد (۲۰).

دمین N-ترمینال eRF3/GSPT1 شامل یک بسط پلی‌گلیسین است که به وسیله‌ی تکرارهای n (GGC) کد می‌شود که مکان این تکرارها درون یک ناحیه‌ی ۱۱۹۵ bp از جزایر CpG است که در 3'-UTR ۵' آگزون ۱ و بخشی از ایترون ۱ ژن eRF3/GSPT1 می‌باشد (۱۹). اولین مطالعات بر روی پلی مورفیسیم تکرارهای GGC در ژن eRF3 توسط Brito و همکاران به منظور بررسی ارتباط تکرارهای GGC در این ژن با سرطان معده در یک جمعیت پرتغالی مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعات اولیه روی پلی مورفیسیم تکرارهای n (GGC) ژن

بحث

GSPT1 یک GTPase وابسته به eRF1 است که در یک کمپلکس واسطه سبب پایان ترجمه در یوکاریوت‌ها می‌شود. در کنار نقش مهم eRF3/GSPT1 در ترجمه، ارتباط آن با تنظیم سیکل سلولی و عبور از مرحله‌ی G1 به مرحله‌ی S در سیکل سلولی، سازمان‌بندی سایتواسکتون، mRNA decay، بازسازی ریبوزوم، آپوپتوز و تومورزایی مشخص شده است (۲۰-۱۲). بنابراین، با توجه به نقش مهمی که این ژن در حیاط سلول دارد، تغییرات جهشی و یا تغییر در بیان این ژن می‌تواند سبب افزایش خطر ابتلا به سرطان شود. نقش eRF3/GSPT1 در سرطان اولین بار توسط Brito و همکاران بر روی سرطان معده مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق، ۹ مورد از ۲۵ مورد بررسی شده افزایش بیان ژن GSPT1 را نشان دادند. بنابراین پیشنهاد شد افزایش بیان GSPT1 ممکن است سبب افزایش بازدهی ترجمه‌ی رونوشت‌های خاص آنکوژنیک شود. با توجه به نقش GSPT1 در تنظیم سیکل سلولی و آپوپتوز، ارتباط این ژن با سرطان دور

روده‌ی بزرگ در جمعیت اصفهان مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد افراد دارای آلل ۱۲ تکرار بیشتر در خطر ابتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با افراد دارای آلل‌های ۱۱، ۱۰ و ۷ تکرار می‌باشند. همچنین ارتباط معنی‌داری بین حضور آلل ۱۲ تکرار و سابقه‌ی فامیلی سرطان کولورکتال و افزایش خطر ابتلا به این سرطان مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

در پایان از حمایت معاونت تحقیقات و فناوری و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان در راستای انجام این پروژه، از کلیه‌ی بیماران محترم، بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان به خاطر در اختیار قرار دادن اطلاعات پزشکی و نمونه‌ی خون بیماران و خانم الهه جان‌نشاری به خاطر یاری ایشان در جمع‌آوری نمونه‌ها و کلیه‌ی افرادی که به صورت مادی و معنوی در انجام این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۱ eRF3/GSPT1 احتمال داده شد که این سایت پلی مورفیسم در ابتلا به سرطان نقش دارد. سپس، Malta-Vacas و همکاران، ارتباط تکرارهای GGC در آگزون شماره‌ی ۱ ژن ۱ eRF3/GSPT1 را در سرطان‌های پستان و کولورکتال در جمعیت پرتغال مورد بررسی قرار دادند. بر اساس مطالعاتی که بر روی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در جمعیت پرتغال انجام شد، آلل ۱۲ تکرار تنها در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (۱/۰۹ درصد) مشاهده شد، در حالی که افراد جمعیت شاهد فاقد این آلل بودند (۱۹). در این مطالعه، ارتباط آلل ۱۲ تکرار GGC با افزایش خطر ابتلا به سرطان کولورکتال تأیید شد. در ایران، اولین مطالعات بر روی پلی مورفیسم این ناحیه‌ی تکراری توسط میری و همکاران بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان در جمعیت اصفهان انجام شد (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط پلی مورفیسم تکرارهای GGC در آگزون شماره‌ی ۱ ژن ۱ eRF3/GSPT1 در بیماران مبتلا به سرطان

References

1. Sameer AS, Abdullah S, Banday MZ, Syeed N, Siddiqi MA. Colorectal cancer, TGF-signaling and SMADs. *Int J Genet Mol Biol* 2010; 2(6): 101-11.
2. Esna-Ashari F, Sohrabi MR, Abadi AR, Mehrabian AA, Mofid B, Bohluli M, et al. Colorectal cancer prevalence according to survival data in Iran-2007. *Iran J Cancer Prev* 2009; 2(1): 15-8.
3. Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, Wijnen JT, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin* 2006; 56(4): 213-25.
4. Li M, Wang J, Yang L, Gao P, Tian QB, Liu DW. eRF3b, a biomarker for hepatocellular carcinoma, influences cell cycle and phosphorylation status of 4E-BP1. *PLoS One* 2014; 9(1): e86371.
5. Bertram G, Bell HA, Ritchie DW, Fullerton G, Stansfield I. Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA* 2000; 6(9): 1236-47.
6. Ito K, Frolova L, Seit-Nebi A, Karamyshev A, Kisselev L, Nakamura Y. Omnipotent decoding potential resides in eukaryotic translation termination factor eRF1 of variant-code organisms and is modulated by the interactions of amino acid sequences within domain 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(13): 8494-9.
7. Kisselev L, Ehrenberg M, Frolova L. Termination of translation: interplay of mRNA,

- rRNAs and release factors? *EMBO J* 2003; 22(2): 175-82.
8. Frolova L, Le G, X, Zhouravleva G, Davydova E, Philippe M, Kisselev L. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* 1996; 2(4): 334-41.
 9. Nakamura Y, Ito K, Isaksson LA. Emerging understanding of translation termination. *Cell* 1996; 87(2): 147-50.
 10. Hoshino S, Miyazawa H, Enomoto T, Hanaoka F, Kikuchi Y, Kikuchi A, et al. A human homologue of the yeast GST1 gene codes for a GTP-binding protein and is expressed in a proliferation-dependent manner in mammalian cells. *EMBO J* 1989; 8(12): 3807-14.
 11. Hoshino S, Imai M, Mizutani M, Kikuchi Y, Hanaoka F, Ui M, et al. Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF). Its identification as eRF3 interacting with eRF1. *J Biol Chem* 1998; 273(35): 22254-9.
 12. Chauvin C, Salhi S, Jean-Jean O. Human eukaryotic release factor 3a depletion causes cell cycle arrest at G1 phase through inhibition of the mTOR pathway. *Mol Cell Biol* 2007; 27(16): 5619-29.
 13. Chai BF, Wang W, Liang AH. Expression, characterization and immunolocalization of translation termination factor eRF3 in the ciliate *Euplotes octocarinatus*. *Res Microbiol* 2006; 157(3): 235-40.
 14. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 1999; 8(10): 1893-900.
 15. Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 1999; 96(3): 307-10.
 16. Hegde R, Srinivasula SM, Datta P, Madesh M, Wassell R, Zhang Z, et al. The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* 2003; 278(40): 38699-706.
 17. Lee JA, Park JE, Lee DH, Park SG, Myung PK, Park BC, et al. G1 to S phase transition protein 1 induces apoptosis signal-regulating kinase 1 activation by dissociating 14-3-3 from ASK1. *Oncogene* 2008; 27(9): 1297-305.
 18. Riggins GJ, Lokey LK, Chastain JL, Leiner HA, Sherman SL, Wilkinson KD, et al. Human genes containing polymorphic trinucleotide repeats. *Nat Genet* 1992; 2(3): 186-91.
 19. Malta-Vacas J, Ferreira P, Monteiro C, Brito M. Differential expression of GSPT1 GGCn alleles in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 195(2): 132-42.
 20. Brito M, Malta-Vacas J, Carmona B, Aires C, Costa P, Martins AP, et al. Polyglycine expansions in eRF3/GSPT1 are associated with gastric cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2005; 26(12): 2046-9.
 21. Miri M, Hemati S, Safari F, Tavassoli M. GGCn polymorphism of eRF3a/GSPT1 gene and breast cancer susceptibility. *Med Oncol* 2012; 29(3): 1581-5.

The Study of GGC Repeat Polymorphism in Exon 1 of GSPT1/eRF3 Gene and its Association with the Risk of Colorectal Cancer

Zahra Usefzadeh¹, Manoochehr Tavassoli PhD², Simin Hemati MD³, Forouzan Safari⁴

Original Article

Abstract

Background: Colorectal cancer is the third leading cause of cancer deaths in men and the fourth in women in Iran. Eukaryotic release factor 3 (eRF3) is a GTPase associated with eRF1 in a complex that mediates translation termination in eukaryotes. Apart from its role in translation termination, the eukaryotic translation release factor 3 (eRF3) is involved in several critical cellular processes, such as cell cycle regulation and is essential for the G1 to S phase transition of the cell cycle (GSPT1), cytoskeleton organization, mRNA decay, recycle of ribosomes and apoptosis. Data from two previous studies on polymorphic GGC repeats located in exon 1 of the GSPT1/eRF3 gene suggest that this polymorphic site may play a role in cancer susceptibility.

Methods: In this research, we studied the GGC repeat polymorphism in GSPT1/eRF3 gene among 153 patients with colorectal cancer and 280 healthy controls in Isfahan region, Iran. The GGC expansion was amplified via polymerase chain reaction (PCR) method and alleles in variable sizes were selected via polyacrylamide gel and sequenced directly. These sequenced alleles were used as allele specific markers.

Findings: Four different lengths of the GGC repeat in the range of 7, 10, 11, and 12 were observed. The most common genotype in controls and patients was homozygous with allele length of 10. A direct correlation was found between the presence of the 12-Gly allele of this gene and development of colorectal cancer (OR = 2.66, P = 0.04). There was a strong association between the allelic lengths of eRF3/GSPT1 polymorphism and family history of colorectal cancer, too (OR = 10.7, P = 0.0001).

Conclusion: Our primary data demonstrate that people carrying allele of 12 GGC, especially 11/12 and 12/12 genotypes are at significantly higher risk of developing colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer, Polymorphism, Eukaryotic release factor 3 (eRF3)

Citation: Usefzadeh Z, Tavassoli M, Hemati S, Safari F. **The Study of GGC Repeat Polymorphism in Exon 1 of GSPT1/eRF3 Gene and its Association with the Risk of Colorectal Cancer.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(311): 2006-14

1- Student, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Radiotherapy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Laboratory Assistant, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Manoochehr Tavassoli PhD, Email: manoochehr@biol.ui.ac.ir

بررسی سطح ویتامین D در آخر سه ماهه‌ی اول بارداری و ارتباط آن با آنمی، واژینوز باکتریال و دندان درد در مادران باردار

دکتر سهیلا ریاحی نژاد^۱، دکتر هتاو قاسمی تهرانی^۲، الهام عالی‌پور هفشجانی^۳، مژده قاسمی^۴،
فرشاد نوری‌زاده دهکردی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: حاملگی با تغییرات مشخص در متابولیسم کلسیم همراه است. در طی حاملگی، جذب کلسیم از لوله‌ی گوارش با غلظت‌های بالای ویتامین D افزایش می‌یابد. ویتامین D در بارداری سبب افزایش HPL (Human placental lactogen) و hCG (Human chorionic gonadotropin)، استروژن و پروژسترون در یک جفت رسیده می‌شود و کمبود آن، سبب افزایش پره‌اکلامپسی، دیابت حاملگی، دندان درد، آنمی، واژینوز باکتریال و در نوزاد سبب صرع پس از زایمان، کاهش رشد داخل رحمی، زایمان زودرس، استئومالاسی، ریکتز نوزادی و کرانیوتابیس می‌گردد.

روش‌ها: این مطالعه به صورت مقطعی و با طرح توسعه‌ای در زنان باردار سه ماهه‌ی اول (هفته‌ی ۱۲) مراجعه کننده به بیمارستان‌های آموزش شریعی و الزهرا (س) در سال ۹۲-۱۳۹۱ صورت گرفت. بازه‌ی زمانی انجام پژوهش ۱ سال و تعداد ۲۸۰ فرد در طی محاسبه‌ی آماری در نظر گرفته شدند. روش جمع‌آوری نمونه آسان بود و برای هر نمونه، در طی سه ماهه‌ی اول بارداری، آزمایش ویتامین D ۱/۲۵ (OH)۲ درخواست شد. سطح سرمی ویتامین D با دستگاه E-lex's و روش الکتروکمی لومینسانس (ECLIA یا Electro-chemi luminescence immuno assay) اندازه‌گیری شد و اطلاعات مربوط به دریافت مکمل توسط مادران، وضعیت عمومی سلامت، مصرف دارو در طی بارداری، وزن قبل از حاملگی، وزن سه ماهه‌ی اول بارداری، سن مادر، محل زندگی، وضعیت دریافت مکمل ویتامین D، سطح هموگلوبین مادر، بروز عفونت واژینوز باکتریال و دندان درد در طی سه ماهه‌ی اول بارداری از طریق پرسش‌نامه جمع‌آوری شد. کلیه‌ی داده‌ها در نرم‌افزار SPSS با آزمون‌های t مستقل و χ^2 تحلیل گردید.

یافته‌ها: سطح ویتامین D در ۲۸۰ خانم باردار، ۱-۸۰ nmol/dl بود. ویتامین D در ۴ گروه با کمبود شدید (۰-۲۰ nmol/dl)، متوسط (۲۰-۴۰ nmol/dl) و خفیف (۴۰-۶۰ nmol/dl) ویتامین D و طبیعی (بالای ۶۰ nmol/dl) مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط معنی‌داری بین سطح ویتامین D با عوامل وابسته به دست آمد.

نتیجه‌گیری: در مادرانی که ویتامین D کمتری داشتند، میزان بروز آنمی، واژینوز باکتریال و دندان درد بیشتر بود.

واژگان کلیدی: ویتامین D، آنمی، واژینوز باکتریال، حاملگی

ارجاع: ریاحی‌نژاد سهیلا، قاسمی تهرانی هتاو، عالی‌پور هفشجانی الهام، قاسمی مژده، نوری‌زاده دهکردی فرشاد. بررسی سطح ویتامین D در آخر سه ماهه‌ی اول بارداری و ارتباط آن با آنمی، واژینوز باکتریال و دندان درد در مادران باردار. مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۱): ۲۰۲۴-۲۰۱۵

۱- استادیار، گروه بیماری‌های زنان و مامایی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه بیماری‌های زنان و زایمان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد، اصفهان، ایران

۴- ماما، دفتر پژوهشی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

اگر چه ویتامین D زیر حد متوسط یکی از مشکلات جامعه‌ی قرن ۲۱ است، اما برخی از افراد در خطر بیشتری برای کاهش این ویتامین می‌باشند. آشکارترین نمونه خانم‌ها هستند. در خانم‌ها به ویژه در زمان بارداری و شیردهی، نیاز به ویتامین D بیشتر خود را نشان می‌دهد. حاملگی با تغییرات مشخص در متابولیسم کلسیم همراه است که هدف اساسی از این تغییرات، تأمین کلسیم کافی برای رشد و معدنی‌سازی اسکلت جنین است. در واقع، نیاز به ویتامین D در مقطعی از زندگی بیشتر است که این مقاطع عبارت از دوران جنینی، شیردهی مراحل اولیه‌ی کودکی، بلوغ و بارداری هستند که کمبود ویتامین D در این دوران نمود بیشتری دارد (۱). به نظر می‌رسد که کمبود ویتامین D سبب بروز آنمی و دندان درد و واژینوز باکتریال در طی حاملگی شده است (۲).

در واقع، افزایش ویتامین D ۱/۲۵ (OH) در انتهای تریمستر اول سبب افزایش جذب و هموستاز کلسیم می‌گردد و در واقع، این ویتامین یک تنظیم کننده‌ی انتقال کلسیم از جفت می‌باشد (۳).

شاید اثرات مهم ویتامین D به ایمنی مربوط به توانایی ذاتی ویتامین D در افزایش به پاسخ ایمنی ذاتی به خصوص فعالیت ضد میکروبی آن باشد (۴). بنابراین با توجه به این مشکلات، تعیین سطح ویتامین D در دوران بارداری و درمان آن می‌تواند در پیشگیری از بسیاری از عوارض مادری و نوزادی نقش داشته باشد. شیوع کمبود ویتامین D در بسیاری از کشورها در حال افزایش است؛ به گونه‌ای که بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که شیوع بالینی و تحت بالینی کمبود ویتامین D به علت افزایش نیاز در

دوره‌ی حاملگی بیشتر است؛ چرا که جنین به طور مستقیم به ذخایر ویتامین D مادری وابسته است (۵). در جفت و بافت‌های بارداری، طیف وسیعی از عوامل ضد باکتریال و ضد ویروس تولید می‌شود. به نظر می‌رسد که سطح بالای از تولید لوکال ویتامین D در جفت بر روی این عوامل آنتی‌میکروبیال اثر بگذارند (۲).

مطالعات *In vitro* نشان داده‌اند که ویتامین D باعث بروز فعال‌سازی در پروتئین ضد باکتری در دسیدوای مادر و تروفوبلاست جنین می‌شود (۶).

در مواردی بروز این پروتئین وابسته به ویتامین D باعث از بین رفتن داخل سلولی *E. coli* (*Escherichia coli*)، یا کمبود این ویتامین باعث افزایش بروز واژینوز باکتریال در سه ماهه‌ی اول بارداری می‌شود (۴).

مطالعات بر روی کشت سلول‌های دسیدوایی نشان داده‌اند که درمان با ویتامین D سبب بروز طیف وسیعی از سیتوکین‌ها و منجر به مهار التهاب جفتی می‌شود (۷).

همچنین در مطالعات دیگری شیوع کم خونی ۸۱/۶ درصد در طی حاملگی گزارش شده است. شیوع کم خونی در سه ماهه‌ی اول، دوم و سوم بارداری به ترتیب ۱۰/۳، ۱۳/۵ و ۱۲/۷ درصد بوده است. کم خونی در بین زنان باردار از شیوع قابل توجهی برخوردار است. مطالعات نشان داده است که ارتباط معنی‌داری بین کمبود ویتامین D و آنمی وجود دارد؛ به گونه‌ای که کمبود ویتامین D سبب بروز ۱۲ درصدی آنمی در سه ماهه‌ی اول و ۵۰ درصدی در طی سه ماهه‌ی سوم بارداری شده است (۷).

ویتامین D همچنین سبب افزایش میزان جذب Ca

(Mild) برابر $40-60$ nmol/dl و طبیعی بالای 60 nmol/dl تعیین گردید.

اطلاعات مربوط به دریافت مکمل توسط مادران، وضعیت عمومی سلامت، مصرف دارو، وزن قبل از حاملگی، وزن مادر در سه ماهه‌ی اول بارداری، سن مادر، محل زندگی مادر، میزان هموگلوبین در طی سه ماهه‌ی اول بارداری، بروز واژینوز باکتریال و دندان درد از طریق پرسش‌نامه جمع‌آوری شد و در طی مطالعه‌ی آماری تحلیل گردید.

کلیه‌ی داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16 SPSS Inc., Chicago, IL) ذخیره و با استفاده از آزمون‌های t مستقل و χ^2 تحلیل گردید.

معیارهای ورود به مطالعه: کلیه‌ی زنان باردار سه ماهه‌ی اول مراجعه کننده به درمانگاه زنان با تعداد ۱-۴ بارداری، نداشتن بیماری مزمن یا ناتوان کننده و عدم مصرف مکمل یا داروهای مؤثر در سطح آزمایشگاهی ویتامین D وارد مطالعه شدند. از کلیه‌ی مادران قبل از ورود به مطالعه رضایت گرفته شد.

معیارهای خروج از مطالعه: عدم رضایت مادران باردار از انجام آزمایش، مصرف هر گونه مکمل یا داروی مؤثر بر سطح آزمایشگاهی ویتامین D، وجود بیماری مزمن و ناتوان کننده در مادر و نیز هر گونه بیماری زمینه‌ای که بر سطح ویتامین D و Hb (Hemoglobin) مادر اثر بگذارد.

آمار توصیفی شامل جداول توزیع فراوانی و تعیین میانگین \pm انحراف معیار بود. در بخش آمار استنباطی، از آزمون‌های χ^2 ، Fisher's exact، Mann-Whitney، t مستقل و ضریب همبستگی Pearson و Spearman استفاده شد.

(کلسیم) دندان‌ها می‌شود. به گونه‌ای که در طی مطالعات انجام شده میزان بروز دندان درد در افراد با کمبود ویتامین D حدود ۲ درصد گزارش شده است (۸).

با توجه به نقش ویتامین D و بروز عوارض متعدد بارداری ناشی از کمبود این ویتامین و ذکر این نکته که ویتامین D به عنوان یکی از ریز مغذی‌های ضروری بدن می‌تواند منجر به آنمی، واژینوز باکتریال و دندان درد گردد.

در این مطالعه، سطح ویتامین D و ارتباط آن با بروز آنمی، واژینوز باکتریال و دندان درد در بیمارستان‌های آموزشی شریعتی و الزهرا (س) در سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ در زنان باردار سه ماهه‌ی اول (هفته‌ی ۱۲) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

بازه‌ی زمانی انجام این پژوهش، یک سال بود و تعداد ۲۸۰ فرد در طی محاسبه‌ی آماری انتخاب شدند. در طی این مطالعه، از مادران باردار به روش نمونه‌گیری آسان در سه ماهه‌ی اول حاملگی آزمایش ویتامین D با نمونه‌ی خون گرفته شد. نمونه از بیمار اخذ شد و در آزمایشگاه مشخص و با رعایت استانداردهای آزمایش بررسی گردید. سطح سرمی ویتامین D با دستگاه E-laxis و روش الکتروکمی لومینسانس (Electro-chemi luminescence immuno assay یا ECLIA) اندازه‌گیری شد و سپس میزان برآورد آزمایشگاهی سطح ویتامین D در ۴ گروه کمبود شدید (Severe) برابر $0-20$ nmol/dl، کمبود متوسط (Mod) مساوی $20-40$ nmol/dl، کمبود خفیف

یافته‌ها

در این تحقیق، ۲۸۰ مادر مورد بررسی قرار گرفتند. دامنه‌ی سنی مادران ۱۸-۳۸ سال با میانگین $26/2 \pm 4/81$ سال بود. توزیع فراوانی کمبود ویتامین D در گروه با کمبود شدید ۸۰/۱ درصد، در گروه کمبود متوسط ۱۲/۱ درصد، در گروه کمبود خفیف ۵/۳ درصد و در گروه طبیعی ۲/۵ درصد بود. توزیع فراوانی کمبود ویتامین D در مادران مورد مطالعه بر حسب سطح تحصیلات در جدول ۱ آمده است. توزیع فراوانی کمبود ویتامین D در مادران مورد

مطالعه بر حسب تعداد حاملگی در جدول ۲ آمده است.

ارتباط معنی‌داری بین کمبود ویتامین D و تعداد بارداری وجود داشت؛ به گونه‌ای که با افزایش تعداد بارداری، میزان کمبود ویتامین D کاهش نشان داد ($P = 0/050$).

بین سن و میزان کمبود ویتامین D ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($P = 0/050$). ارتباط توزیع سنی با کمبود ویتامین D در در مادران باردار در جدول ۳ آمده است.

جدول ۱. توزیع فراوانی کمبود ویتامین D در مادران مورد مطالعه بر حسب سطح تحصیلات

وضعیت ویتامین D (درصد)	تحصیلات	زیر دیپلم	دیپلم	فوق دیپلم	لیسانس	فوق لیسانس
کمبود شدید	۶/۰	۵۵/۰	۱۲/۴	۲۳/۴	۲/۸	
کمبود متوسط	۹/۱	۵۱/۵	۲۱/۱	۲۷/۲	۰	
کمبود خفیف	۰	۴۶/۲	۷/۷	۲۳/۱	۲۳/۱	
طبیعی	۰	۲۰/۰	۰	۶۰/۰	۲۰/۰	

جدول ۲. توزیع فراوانی کمبود ویتامین D در مادران مورد مطالعه بر حسب تعداد حاملگی

وضعیت ویتامین D (درصد)	حاملگی اول	حاملگی دوم	حاملگی سوم
کمبود شدید	۶۹/۸	۲۳/۹	۶/۳
کمبود متوسط	۶۳/۶	۲۱/۲	۱۵/۲
کمبود خفیف	-	۸۰/۰	۲۰/۰
طبیعی	-	۸۰/۰	۲۰/۰

جدول ۳. مقایسه‌ی توزیع فراوانی کمبود ویتامین D در مادران مورد مطالعه بر حسب سن و شاغل بودن

وضعیت ویتامین D	متوسط سن (سال)	تعداد	خانه‌دار	شاغل
کمبود شدید	۲۵/۴	۲۱۷	٪۷۶/۶	٪۲۳/۴
کمبود متوسط	۲۶/۱	۳۳	٪۷۱/۰	٪۲۹/۰
کمبود خفیف	۲۷/۷	۱۴	٪۵۰/۰	٪۵۰/۰
طبیعی	۳۳/۴	۵	٪۲۰/۰	٪۸۰/۰

جدول ۴. توزیع فراوانی کمبود ویتامین D در مادران مورد مطالعه بر حسب وزن قبل و حین حاملگی

وضعیت ویتامین D	وزن قبل از بارداری (kg)	وزن در سه ماهه اول (kg)
کمبود شدید	۶۰/۶۷	۶۰/۹۸
کمبود متوسط	۶۳/۵۰	۶۳/۱۵
کمبود خفیف	۶۴/۵۷	۶۴/۹۲
طبیعی	۶۵/۴۰	۶۶/۲۰

جدول ۵. ارتباط بین فراوانی کمبود ویتامین D و بروز واژنیوز باکتریال

سطح ویتامین D (nmol/dl)	بروز واژنیوز باکتریال (درصد)	عدم بروز واژنیوز باکتریال (درصد)
۰-۲۰	۸۲/۲	۱۷/۸
۲۰-۴۰	۵۳/۱	۴۶/۹
۴۰-۶۰	۳۰/۸	۶۹/۲
بالای ۶۰	۴۰	۶۰

مقدار وزن در گروه کمبود خفیف ویتامین D برابر ۵۳ kg و بیشترین مقدار ۷۵ kg بود. کمترین مقدار وزن در گروه دارای مقادیر طبیعی ویتامین D نیز ۶۰ kg و بیشترین وزن ۷۳ kg بود؛ به گونه‌ای که کمترین مقدار وزن در گروه کمبود شدید در سه ماهه اول بارداری ۴۵ kg و بیشترین مقدار، ۸۵ kg بود و در گروه کمبود متوسط، کمترین وزن ۵۰ kg و بیشترین وزن ۷۹ kg بود. در گروه کمبود خفیف، کمترین وزن ۵۳ kg و بیشترین وزن ۷۵ kg و در گروه دارای ویتامین D طبیعی، کمترین میزان وزن مادر در طی سه ماهه اول بارداری ۶۰ kg و بیشترین مقدار وزن ۷۳ kg بود.

ارتباط بین فراوانی کمبود ویتامین D و بروز واژنیوز باکتریال در جدول ۵ آمده است.

مطالعه‌ی حاضر با اندازه‌گیری سطح هموگلوبین نشان داد که در افراد مبتلا به آنمی بارداری (Hb زیر ۱۱)، متوسط ویتامین D، ۸/۴۸ nmol/dl و در افراد با Hb بالای ۱۱، متوسط میزان ویتامین D،

با توجه به توزیع سنی مادران بر اساس شدت کمبود ویتامین D، با افزایش سن مادران میزان کمبود ویتامین D کاهش نشان داد. همچنین در مادران شاغل، کمبود ویتامین D کمتر از مادران خانه‌دار بود؛ این ارتباط معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۱۲$).

ارتباط معنی‌داری نیز بین سطح ویتامین D و وزن قبل از بارداری مادران وجود داشت ($P = ۰/۰۴۰$). نتایج بررسی وضعیت کمبود ویتامین D بر اساس وزن مادران در جدول ۴ آمده است.

این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش وزن مادر قبل از بارداری، میزان کمبود ویتامین D کاهش یافته است و مادران با افزایش وزن بیشتر در سه ماهه اول بارداری، مقدار ویتامین D بیشتری نیز دریافت کرده‌اند.

در واقع، کمترین مقدار وزن در گروه کمبود شدید ویتامین D برابر ۴۵ kg و بیشترین مقدار، ۸۳ kg بود. کمترین مقدار وزن در گروه کمبود متوسط ویتامین D مساوی ۴۹ kg و بیشترین مقدار ۷۷ kg بود. کمترین

19/32 nmol/dl می باشد.

در واقع از بین 280 مادر باردار مورد مطالعه، 129 نفر هموگلوبین زیر 11 و 141 نفر هموگلوبین بالای 11 داشتند (جدول 6).

همچنین در زمینه‌ی بروز دندان درد، مشاهده شد که با افزایش ویتامین D، بروز دندان درد کاهش معنی داری داشته است ($P = 0/010$) (جدول 7).

بحث

این مطالعه با هدف بررسی سطح ویتامین D در مادران باردار سه ماهه‌ی اول و تعیین ارتباط کمبود ویتامین D با بروز آنمی، دندان درد و واژینوز باکتریال صورت گرفت. تعداد اولیه‌ی افراد مورد مطالعه 330 نفر بود که به دلیل عوامل مخدوشگر، 50 نفر از مطالعه خارج شدند و تعداد نهایی به 280 نفر رسید.

در این مطالعه توصیف سنی خاصی جهت مادران تعریف نشده بود و تمامی مادران باردار به صورت تصادفی با محدوده‌ی سنی مختلف در این تحقیق شرکت داشتند.

از بین مادران باردار مورد مطالعه، کمبود شدید ویتامین D با فراوانی 80/3 درصد، بیشتر از سایر گروه‌ها مشاهده گردید؛ این امر بیانگر آن است که طیف وسیعی از مادران باردار، کمبود شدید ویتامین D (زیر 20 nmol/dl) دارند.

در مطالعه‌ی زنان باردار آسیایی مهاجر مقیم لندن نیز همچون مطالعه‌ی حاضر، شیوع بالای کمبود ویتامین D در بارداری گزارش شده است. در این مطالعه اعلام شد که 37 درصد از مادران مورد مطالعه ویتامین D کمتر از 4 داشته‌اند (3).

همچنین در مطالعه‌ی عینی و همکاران در دانشگاه تهران، اعلام شد که در سه ماهه‌ی اول بارداری، غلظت ویتامین D در 20 درصد زنان باردار کمتر از 10 nmol/dl و در 40 درصد زنان کمتر از 20 nmol/dl است و بر این اساس، اعلام گردید که کمبود کلی ویتامین D در طی بارداری 20 درصد می باشد (9). هاشمی پور و همکاران نیز در مطالعه‌ی دیگری این کمبود را 9/6 تا 57/6 درصد اعلام کردند (10).

جدول 6. ارتباط بین فراوانی کمبود ویتامین D و سطح هموگلوبین مادران باردار

سطح ویتامین D (nmol/dl)	بیشترین میزان هموگلوبین	کمترین میزان هموگلوبین
0-20	14/30	7/80
20-40	13/40	10/30
40-60	15/60	11/50
بالای 60	15/30	11/50

جدول 7. ارتباط بین کمبود ویتامین D و بروز دندان درد در مادران باردار

سطح ویتامین D (nmol/dl)	بروز دندان درد (درصد)	عدم بروز دندان درد (درصد)
0-20	59/6	40/4
20-40	12/5	87/5
40-60	0	100
بالای 60	0	100

($P = 0/012$). متوسط سطح ویتامین D در مادران خانه‌دار $12/25 \text{ nmol/dl}$ و در مادران شاغل $14/01 \text{ nmol/dl}$ بود ($\chi^2 = 6/342$). این نشان می‌دهد که در مادران شاغل میزان کمبود ویتامین D کمتر و متوسط میانگین ویتامین D بالاتر می‌باشد.

همچنین ارتباط معنی‌داری بین کمبود ویتامین D و وزن قبل از بارداری وجود داشت ($P = 0/040$)؛ به گونه‌ای که در مادران با کمبود شدید ویتامین D، متوسط وزن قبل از بارداری $60/67 \text{ kg}$ و در مادران با ویتامین D طبیعی متوسط وزن $65/4 \text{ kg}$ می‌باشد و این نشان می‌دهد که در مادران با وزن بیشتر قبل بارداری، میزان کمبود ویتامین D کمتر است.

همچنین این مطالعه نشان داد که در مادرانی که افزایش وزن بیشتری در طی سه ماهه‌ی اول بارداری داشتند، میزان کمبود ویتامین D کمتر است. متوسط وزن مادران در گروه با کمبود شدید ویتامین D، $60/98 \text{ kg}$ و در گروه با ویتامین D طبیعی، حدود $66/2 \text{ kg}$ می‌باشد.

در این مطالعه، ارتباط بین سطح ویتامین D و بروز واژینوز باکتریال مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد در افراد با ویتامین D بالاتر، بروز واژینوز باکتریال در طی بارداری کمتر است.

Liu و همکاران در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های منوسیت در دو گروه با ویتامین D کافی و ویتامین D ناکافی نیز اعلام کردند که در گروه با ویتامین D کافی، فعالیت ضد میکروبی بیشتر است (۷).

Chatelain و همکاران نیز در مطالعه‌ی دیگری اعلام کردند که بروز پروتئین وابسته به ویتامین D باعث امحای داخل سلولی عفونت‌ها می‌شود (۱۱).

همچنین Bodnar و همکاران اعلام کردند که

سطح تحصیلات مادران مورد مطالعه در ۴ گروه زیر دیپلم، فوق دیپلم، لیسانس و فوق لیسانس به بالا تعریف شد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، تحصیلات زیر دیپلم تنها در مادران با کمبود شدید و متوسط ویتامین D دیده می‌شود؛ به گونه‌ای که در مادران با کمبود شدید ویتامین D، ۶ درصد و در مادران با کمبود متوسط ویتامین D، ۹/۱ درصد تحصیلات زیر دیپلم داشتند و افراد با کمبود خفیف و طبیعی، تحصیلات دیپلم به بالا داشتند.

اگر چه سطح ویتامین D در افراد با تحصیلات بالاتر بیشتر است؛ اما این افزایش معنی‌دار نبود ($P = 0/600$) و شاید به دلیل تصادفی بودن انتخاب افراد، نتایج معنی‌دار نشده است.

در ۴ گروه مورد مطالعه، میزان طبیعی ویتامین D در افراد با حاملگی اول دیده نشد.

در هر ۳ گروه کمبود شدید، متوسط و خفیف ویتامین D، بیشترین افراد حاملگی اول را تجربه کردند. در واقع، این نشان می‌دهد که با افزایش تعداد بارداری، درصد کمبود ویتامین D کاهش می‌یابد که شاید به دلیل آموزش بهتر افراد و کسب تجربه‌ی تغذیه‌ای یا درمان با مکمل ویتامین D بعد از حاملگی اول باشد.

همچنین، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که با افزایش سن مادر، میزان کمبود ویتامین D به طور معنی‌داری در طی بارداری کاهش می‌یابد ($P = 0/050$)؛ به گونه‌ای که در مادران با کمبود شدید ویتامین D، متوسط سن $25/4$ سال و در مادران با ویتامین D طبیعی، متوسط سن $33/4$ سال بود.

در مطالعه‌ی انجام شده، ارتباط معنی‌داری بین سطح ویتامین D و شغل مادر باردار وجود داشت

حاملگی تا حد ۹ درصد، بروز واژینوز باکتریال ۳/۵ درصد، بروز آنفولانزا در حاملگی ۲ درصد، بروز پره‌اکلامپسی ۵/۲ درصد، بروز سپسیس ۱/۱۳ درصد و افزایش بروز دندان درد ۲ درصد گردد (۱۳). Terpak و همکاران نیز میزان بروز دندان درد در افراد با کمبود ویتامین D را حدود ۲۱ درصد اعلام کردند (۸).

برنامه‌های اصلاح وضعیت تغذیه‌ای به ویژه در مورد زنان باردار ضروری به نظر می‌رسد. تشویق به مصرف غذاهایی با مواد غنی از ریز مغذی‌ها به ویژه ویتامین D و همچنین مواد مغذی به خصوص لبنیات و نیز غنی‌سازی منابع غذایی و تجویز مکمل ویتامین D در افراد حامله توصیه می‌شود.

با توجه به کمبود ویتامین D در بارداری و عوارض آن بر روی جنین و مادر، لازم است قبل از حاملگی و در سه ماهه اول بارداری، سطح ویتامین D اندازه‌گیری شود و بر اساس مقدار ویتامین D مادران باردار، مکمل ویتامین تجویز گردد.

پیشنهاد می‌شود با توجه به این که در اکثر مادران باردار سطح ویتامین D در حد کمبود شدید بود، اندازه‌گیری ویتامین D جزء آزمایش‌های معمول ویتامین D در طی سه ماهه اول بارداری قرار گیرد و پروتکل درمانی علمی جهت جبران کمبود در طی این تریمستر اتخاذ گردد.

کمبود ویتامین D باعث افزایش بروز واژینوز باکتریال در تریمستر اول بارداری شده است (۱۲).

در این تحقیق نیز ارتباط بین کمبود ویتامین D و سطح هموگلوبین مادران در طی سه ماهه اول بارداری، بررسی شد و با توجه به نتایج حاصل، با افزایش میزان ویتامین D، میزان هموگلوبین نیز بالا می‌رود؛ به گونه‌ای که مادران با ویتامین D طبیعی هموگلوبین بالاتر داشتند و بروز آنمی در آن‌ها کمتر بود. در مطالعه‌ی Grant و همکاران بر روی بروز آنمی در خانم‌های باردار با کمبود ویتامین D در سه ماهه اول بارداری، بروز آنمی حدود ۱۲ درصد بود (۱۳).

در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین کمبود ویتامین D و بروز دندان درد در طی سه ماهه اول بارداری مشاهده شد ($P = 0/010$)؛ به گونه‌ای که در افراد با ویتامین D بالای 40 nmol/dl ، بروز دندان درد در طی سه ماهه اول بارداری صفر بوده است. از طرفی، میزان بروز دندان درد در مادرانی که کمبود شدید ویتامین D داشتند، ۵۹/۶ درصد گزارش شده است.

کمبود ویتامین D در حاملگی، منجر به بروز ۱۲ درصدی آنمی در سه ماهه اول و ۵۰ درصد در سه ماهه دوم می‌شود. همچنین سبب افزایش شانس بروز سزارین بین ۳۱/۹-۱۳/۶ درصد می‌گردد. کمبود ویتامین D می‌تواند سبب افزایش بروز دیابت

References

1. Saboor H, Hosseinnzhad A, Maghbouli J, Larijani B. Effect of calcium and vitamin D intake on maternal and neonatal anthropometric parameters. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2007; 12(1): 26-31. [In Persian].
2. Zarean E, Jamal A. Vitamin D and pregnancy. *Iran J Obstet Gynecol* 2011; 6(3): 13-20. [In Persian].
3. Bruns ME, Bruns DE. Vitamin D metabolism and function during pregnancy and the neonatal period. *Ann Clin Lab Sci* 1983; 13(6): 521-30.
4. Adams JS, Liu PT, Chun R, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D in defense of the human immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1117: 94-105.
5. Hollis BW, Wagner CL. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(5): 717-26.
6. Laskarin G, Kammerer U, Rukavina D,

- Thomson AW, Fernandez N, Blois SM. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(3): 255-67.
7. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311(5768): 1770-3.
 8. Terpak Ch, Barr LA, Yu Z, Curtis M. Urgent dental problems and access to care during pregnancy among California women with a live birth, 2008. *Proceedings of National Oral Health Conference*; 2011 Apr 10-13; Pittsburgh, PA, USA.
 9. Eini A, Mirsaeid Ghazi AA, Mirmiran P, Mirbolouki M, Azizi F. Variation of Calcium and Vitamin D and other biochemistry characters in pregnancy. *Iran J Endocrinol Metab* 2003; 5(1): 45-51. [In Persian].
 10. Hashemipour S, Larijani B, Adibi H, Javadi E, Sedaghat M, Pajouhi M, et al. Vitamin D deficiency and causative factors in the population of Tehran. *BMC Public Health* 2004; 4: 38.
 11. Chatelain P. Children born with intra-uterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): long term growth and metabolic consequences. *Endocr Regul* 2000; 34(1): 33-6.
 12. Bodnar LM, Simhan HN, Powers RW, Frank MP, Cooperstein E, Roberts JM. High prevalence of vitamin D insufficiency in black and white pregnant women residing in the northern United States and their neonates. *J Nutr* 2007; 137(2): 447-52.
 13. Grant WB. Adequate vitamin D during pregnancy reduces the risk of premature birth by reducing placental colonization by bacterial vaginosis species. *MBio* 2011; 2(2): e00022-11.

Valuation of Vitamin D Level at the End of First Trimester and its Relation with Anemia, Bacterial Vaginosis, and Toothache in Pregnant Mothers

Soheyla Riahinejad MD¹, Hatav Ghasemi-Tehrani MD², Elham Alipour-Hafshejani³,
Mojdeh Ghasemi⁴, Farshad Nourizadeh-Dehkordi³

Original Article

Abstract

Background: Pregnancy is associated with significant changes in calcium metabolism. During pregnancy, calcium absorption increases through the digestive tube and with high concentration of vitamin D. During pregnancy, vitamin D increases human placental lactogen (HPL), human chorionic gonadotropin (hCG), estrogen and progesterone in a ripe placenta, and its deficiency during pregnancy increases preeclampsia, gestational diabetes, toothache, anemia and bacterial vaginosis in mother, and may cause postpartum seizures, preterm labor (PTL), small for gestational age (SGA), intrauterine growth restriction (IUGR), osteomalacia, infantile rickets, and craniotabes in newborn infants.

Methods: This cross-sectional study with a developmental plan was conducted in the first trimester of pregnancy (week 12) on the women referred to Shariati and Alzahra Teaching Hospitals, Isfahan, Iran, in 2012-2013. The study was done in a range of one year and 280 individuals were selected after statistical calculation. Sample collection method was convenient and for each sample, Vit D (OH) 125 was requested during the first trimester of pregnancy. Vitamin D level was measured using E-lex's and Electrochemi-luminescence method (ECLIA), and information related to supplements received by the mothers, general situation of health, use of medicine during pregnancy, pre-pregnancy weight, first trimester weight, maternal age, place of living, receiving vitamin D, maternal hemoglobin level, bacterial vaginosis infection, and toothache in the first trimester were collected through a questionnaire.

Findings: Vitamin D level in 280 pregnant women ranged from 1 to 80 nmol/dl. Vitamin D deficiency was examined in four groups of severe (0-20 nmol/dl), moderate (20-40 nmol/dl), and mild deficiency (40-60 nmol/dl) and normal (higher than 60 nmol/dl), and a significant relationship was observed between vitamin D level and associated factors.

Conclusion: In this study, anemia, bacterial vaginosis and toothache were more observed in the mothers with low levels of vitamin D.

Keywords: Vitamin D, Anemia, Bacterial vaginosis, Pregnancy

Citation: Riahinejad S, Ghasemi-Tehrani H, Alipour-Hafshejani E, Ghasemi M, Nourizadeh-Dehkordi F: **Valuation of Vitamin D Level at the End of First Trimester and its Relation with Anemia, Bacterial Vaginosis, and Toothache in Pregnant Mothers.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(286): 2015-24

1- Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Student of Medicine, School of Medicine, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

4- Midwife, Research Office, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hatav Ghasemi-Tehrani MD, Email: tehrani@med.mui.ac.ir

بررسی ارتباط بین خونریزی مغزی و بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۲ در بیماران مبتلا به نقص شدید عامل انعقادی XIII

دکتر مجید نادری^۱، محمدرضا یونسی^۲، اکبر درگلاله^۳، دکتر شعبان علیزاده^۴، دکتر احمد کاظمی^۵، شادی طبیبیان^۶، زهرا کاشانی خطیب^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنزیم‌های خانواده‌ی ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs یا Matrix metalloproteinases) نقشی اساسی در تجزیه‌ی غشای پایه، ماتریکس خارج سلولی و بازسازی بافتی ایفا می‌نمایند و در روند بروز خونریزی مغزی دخیل هستند. از طرفی، نقص عامل انعقادی XIII یک بیماری بسیار نادر خونریزی دهنده است که شیوع آن یک در ۲-۱ میلیون نفر تخمین زده می‌شود. خونریزی مغزی علت اصلی مرگ در این بیماران است. این مطالعه به بررسی ارتباط بین بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۲ با خونریزی مغزی در این بیماران پرداخت.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی با بررسی یافته‌های بالینی و کلی بیماران مورد مطالعه، روش Q-Real-time RT-PCR (Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction) برای بررسی کمی مقادیر mRNA ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۲ در ۴۲ بیمار دچار نقص ارثی عامل انعقادی XIII (شامل دو گروه با و بدون سابقه‌ی خونریزی مغزی (به ترتیب گروه‌های مورد و شاهد) به کار گرفته شد. روش مقایسه‌ای ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) برای بررسی سطح بیان ژن‌های هدف استفاده شد. سطوح بیان ژن آنزیم گلیسیرالدهید ۳ فسفات (GAPDH یا Glyceraldehyde ۳-phosphate dehydrogenase) برای استانداردسازی بیان ژن‌های ماتریکس متالوپروتئیناز مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: خونریزی از بند ناف شایع‌ترین علامت بالینی بین همه‌ی بیماران بود. مقادیر بالای بیان ژن MMP-۹ در ۱۳ بیمار گروه مورد (۲۸۷۲ درصد) و ۳ بیمار گروه شاهد (۱۲/۵ درصد) مشاهده شد که نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بود (CI: ۲/۸-۹۵/۳) ($P = ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: بیماران دارای نقص عامل انعقادی XIII طیف وسیعی از علائم بالینی را نشان می‌دهند که دارای اهمیت فراوانی در غربالگری و تشخیص این دسته از بیماران است. بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن MMP-۹ به علت پلی‌مورفیسم یا التهاب مرتبط با بیماری‌زایی خونریزی مغزی در این دسته از بیماران است. شاید بتوان با استفاده از مهارکننده‌های MMP-۹ این اثر را کاهش داد و به کاهش نرخ بستری شدن و مرگ این بیماران کمک نمود.

واژگان کلیدی: نقص عامل انعقادی XIII، خونریزی مغزی، ماتریکس متالوپروتئیناز

ارجاع: نادری مجید، یونسی محمدرضا، درگلاله اکبر، علیزاده شعبان، کاظمی احمد، طبیبیان شادی، کاشانی خطیب زهرا. بررسی ارتباط بین خونریزی مغزی و بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۲ (MMP-2,9) در بیماران مبتلا به نقص شدید عامل انعقادی XIII.

مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۱): ۲۰۳۴-۲۰۲۵

۱- استادیار، گروه خون و انکولوژی کودکان، بیمارستان علی ابن ابی طالب (ع)، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشجوی دکتری، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

ایران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵- استاد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۶- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مقدمه

عامل انعقادی XIII (FXIII یا Factor XIII) پروتئینی از دسته‌ی ترانس گلوتامینازها است که دارای دو زیر واحد کاتالیتیک A (FXIII-A) و دو زیر واحد ناقل B (FXIII-B) می‌باشد و حضور آن در مراحل نهایی آبشار انعقادی الزامی است. عامل XIII فعال به صورت مکانیکی لخته‌ی فیبرین را با پل‌های ارتباطی گاما گلوتامیل لیزین تقویت و از این طریق، لخته را پایدار می‌نماید (۱-۲).

علاوه بر این، عامل XIII انعقادی فعال شده با افزایش اتصال α_2 -plasmin به شبکه‌ی فیبرینی تازه تشکیل شده، مانع تخریب آن توسط سیستم فیبرینولیتیک می‌گردد. نقص ارثی عامل انعقادی XIII به صورت اتوزوم مغلوب به ارث می‌رسد و به شدت نادر و در عین حال از دسته‌ی بیماری‌های خونریزی دهنده‌ی شدید و مرگ‌آور می‌باشد (۲-۳). میانگین شیوع فرم شدید بیماری در بین جمعیت‌های مختلف جهان متفاوت است، اما در حالت کلی، فراوانی یک در ۳-۵ میلیون نفر گزارش شده است (۴).

بسته به مقادیر پلاسماپی عامل XIII، علایم بالینی نقص عامل XIII از ملایم تا شدید متفاوت خواهد بود (۵). بیماری با خونریزی شدید، خونریزی خودبه‌خودی (Central nervous system) CNS، سقط خودبه‌خود، تأخیر در ترمیم زخم و خونریزی از بند ناف که چند روز پس از تولد بروز می‌کند، همراه است. خونریزی مغزی، علت اول مرگ و نهایی‌ترین علامت بیمار از نقص عامل انعقادی XIII می‌باشد. این علامت، تهدید کننده‌ی زندگی فرد و مهم‌ترین علت مرگ این دسته از بیماران در اثر علل خونریزی دهنده است (۴-۷). در حالت کلی، با وجود

درمان‌های نوین، خونریزی داخل جمجمه‌ای، به هر دلیلی که اتفاق بیفتد، به عنوان یکی از شدیدترین اشکال بیماری‌های مرتبط با اعصاب مرکزی شناخته می‌شود؛ به طوری که ۳۰-۵۰ درصد بیماران دچار مرگ می‌شوند (۸-۱۱).

خونریزی مغزی در ۳۰ درصد بیماران دچار نقص ارثی عامل XIII اتفاق می‌افتد و شایع‌ترین علت مرگ در این بیماران در مقایسه با سایر بیماری‌های ارثی خونریزی دهنده است (۱۲). همه‌ی بیماران دچار نقص شدید عامل انعقادی XIII ($FXIII < 1 U/dl$) درمان‌های جایگزین کننده با فراورده‌هایی مثل پلاسما ی تازه منجمد (FFP یا Fresh frozen plasma)، رسوب کرایو و یا کنسانتره‌ی خالص شده‌ی فاکتور XIII (Fibrogammin P) را دریافت می‌نمایند (۱۳، ۵).

از سوی دیگر، ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) یا Matrix metalloproteinases) خانواده‌ی بزرگی از اندوپپتیدازهای وابسته به کلسیم و حاوی روی می‌باشند که در بازسازی بافتی و تجزیه‌ی ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژن‌ها، ژلاتین، گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌های ماتریکس نقش اساسی ایفا می‌نمایند. غشای پایه دارای مقادیر فراوانی از کلاژن نوع ۴، لامینین، فیبرونکتین و الاستین است. نکته‌ی جالب توجه در این باره، توانایی بسیار زیاد دو آنزیم MMP-۲ و MMP-۹ در تجزیه‌ی کلاژن نوع ۴ (بیشترین پروتئین ماتریکس خارج سلولی) است که بیش از همه‌ی پروتئینازهای دیگر است. این توانایی می‌تواند منجر به ایفای نقش مهم آن‌ها در تجزیه‌ی سد خونی-مغزی و ایجاد آسیب شود. اطلاعات بسیار زیادی درباره‌ی این موضوع وجود دارد که افزایش بیان

گروه شاهد انتخاب گردیدند. به منظور اطمینان از شرایط بیماران گروه مورد برای مشارکت آنان در مطالعه، CTscan یا MRI (Magnetic resonance imaging) انجام شده در ۲۴ یا ۴۸ ساعت پس از شروع علائم خونریزی مغزی مورد بررسی قرار گرفت. رضایت‌نامه‌ی امضا شده از همه‌ی مشارکت کنندگان دریافت گردید و مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران تأیید گردیده است.

استخراج اطلاعات، معیارهای ورود و خروج مطالعه

اطلاعات مستند همه‌ی بیماران مراجعه کننده از سراسر استان سیستان و بلوچستان به مرکز هموفیلی شهر زاهدان در مرکز مدارک پزشکی در دسترس بود. اطلاعات بیماران از مدارک پزشکی و پرسش‌نامه‌ی تکمیل شده توسط پزشک معالج استخراج گردید. به منظور ورود به مطالعه، تمامی بیماران دچار نقص عامل XIII دارای سابقه‌ی خونریزی داخل جمجمه‌ای انتخاب گردیدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل سابقه‌ی پزشکی نا کامل، نقص عامل XIII به همراه اختلال خونریزی دهنده‌ی دیگر، هر گونه شواهد آمیلوئید آنژیوپاتی، بیماری کبدی یا تومور مغزی می‌شد. علاوه بر این، همه‌ی بیماران توسط پرسنل آموزش دیده مورد مصاحبه قرار گرفتند و پرسش‌نامه شامل اطلاعات دموگرافیک سن، جنس، علائم خونریزی در طول زندگی و سن در موقع وقوع خونریزی مغزی تکمیل گردید. همه‌ی بیماران به طور منظم تحت آزمایش‌های تشخیصی مننگوآنسفالیت، مننژیست باکتریایی، ویروس HIV (Human immunodeficiency virus)، HBV، (Hepatitis B virus) HAV، (Hepatitis A virus) و

ژن MMP-۲ و MMP-۹ دارای اثرات فراوانی در بیماری‌های خونریزی داخل جمجمه‌ای است.

مطالعات بسیاری نشان داده است که ماتریکس متالوپروتئینازها باعث تجزیه‌ی ترکیبات لایمین پایه می‌شوند که در نهایت، منجر به تخریب سد خونی-مغزی می‌گردد و همچنین در پاسخ‌های التهابی به برخی بیماری‌های نورولوژیک دخیل است. در حالی که به منظور جلوگیری از عوارض مرگ‌آور بالینی، بیماران دارای نقص شدید عامل XIII درمان‌های جایگزین پیشگیرانه دریافت می‌دارند؛ به طوری که کنسانتره‌ی عامل ۱۳ نقص و یا کمبود عامل آن‌ها را جبران می‌نماید (۶)، اما هنوز هم خونریزی داخل جمجمه‌ای علت اصلی مرگ مرتبط با خونریزی در این بیماران است. خونریزی مغزی در این بیماران به صورت مکرر اتفاق می‌افتد و حدود ۳۰ درصد بیماران را درگیر می‌نماید.

هدف این مطالعه بررسی اثرات تغییرات سطح بیان ژن‌های MMP-۲ و MMP-۹ بر بیماری‌های خونریزی مغزی در بیماران مبتلا به نقص شدید ارثی عامل XIII بود (۱۴-۱۵).

روش‌ها

جمعیت مطالعه: این مطالعه‌ی مورد-شاهدی بر روی ۴۲ بیمار با نقص ارثی شدید عامل انعقادی XIII در یک بازه‌ی زمانی ۱۰ ماهه انجام شد. در حالت کلی، ۴۲ بیمار برای مطالعه انتخاب گردیدند که سابقه‌ی خونریزی داخل جمجمه‌ای ۱۸ نفر آن‌ها با مدارک CTscan (Computerized tomography scan) و پرونده‌ی پزشکی تأیید شده بود. ۲۴ نفر باقی‌مانده، پس از تطابق سن و جنس از میان بیماران دیگر به عنوان

HCV (Hepatitis C virus) قرار گرفتند.

معاینات بالینی

بیماران با نقص شدید عامل XIII اغلب دارای آزمایش حلالیت در اورهی ۵ M غیر طبیعی بودند که به خودی خود نشان دهنده‌ی تمایل شدید آن‌ها به خونریزی در بافت‌های مختلف است. معاینات کامل پزشکی بر روی همه‌ی بیماران مشارکت کننده در مطالعه توسط پزشک متخصص در بیماری‌های خونریزی دهنده انجام شد و به صورت مستند ثبت گردید. بیماران از نظر آزمایشگاهی و کلینیکی برای همه‌ی شواهد آمپلوئید، بیماری کبدی، تومورهای مغزی و عفونت‌های ویروسی مورد بررسی قرار گرفتند.

جداسازی RNA

پس از جمع‌آوری نمونه‌ی خون در لوله‌های خلأ حاوی ضد انعقاد EDTA توسط پرسنل (Ethylenediaminetetraacetic acid) آموزش دیده در خون‌گیری با استفاده از روش‌های استریل، نمونه‌ها برای جداسازی RNA در زمانی دیگر در فریزر -75°C قرار گرفتند. RNA_{Total} با استفاده از کیت TRIzol reagent (Invitrogen) با توجه به دستورالعمل سازنده استخراج گردید. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۲ درصد مورد تأیید قرار گرفت.

ساخت cDNA و آنالیز PCR

با استفاده از کیت یک مرحله‌ای Super script one-step RT-PCR kit (Bioneer, South Korea) و پرایمرهای مناسب، مقدار RNA_{Total} $10\ \mu\text{g}$ به cDNA (Complementary DNA) تبدیل گردید. پرایمرهای استفاده شده برای GAPDH

(Glyceraldehyde ۳-phosphate dehydrogenase) (Clontech) به عنوان ژن خانه‌دار (شاهد) استفاده شدند. محصول به دست آمده دارای باند تک و اختصاصی در الکتروفورز ژل آگارز بود.

Real-time RT-PCR کمی

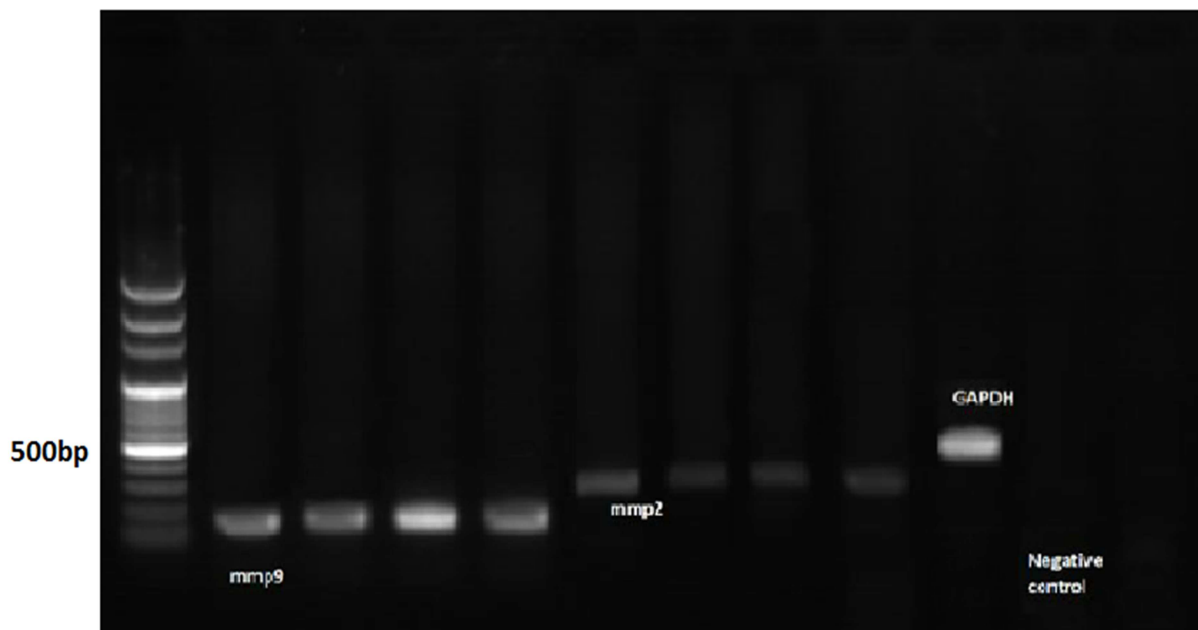
پرایمرهای استفاده شده برای آنالیز بیان ژن‌های MMP-۹، MMP-۲ و GAPDH در جدول ۱ آمده است. همه‌ی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار آنالیز پرایمر اختصاصی (Gene runner) طراحی گردیدند و توالی مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی مربوط (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) بلاست گردید. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays (transcription polymerase chain reaction assays) کمی با استفاده از کیت SYBR green (Fermentas, UK) در دستگاه ABI, step one (Applied biosystems) انجام شد. پس از PCR منحنی آنالیز (Melting curve) بررسی گردید تا ویژگی محصول مورد نظر آزمایش تأیید گردد.

سطح بیان ژن‌ها به صورت مقایسه‌ای با تغییرات سطح بیان ژن GAPDH به عنوان ژن شاهد با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ در نرم‌افزار Light cycler apparatus (Roche, Germany) محاسبه گردید. به منظور اطمینان از ویژگی محصول تکثیر شده، همه‌ی نمونه‌ها در الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردیدند (شکل ۱). نتایج حاصل در نرم‌افزار SPSS (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) به صورت درصد، میان، میانگین و با استفاده از آزمون t محاسبه گردیدند. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برای آنالیز بیان ژن MMP-۹، MMP-۲ و GAPDH

نام ژن	توالی پرایمر ۳	اندازه‌ی قطعه
MMP-۹	Forward: TTGACAGCGACAAGAAGTGG Reverse: CCCTCAGTGAAGCGGTACAT	bp۱۴۷
MMP-۲	Forward: ACAAAGGGATTGCCAGGACC Reverse: ATTAGCGCCTCCATCGTAGC	bp۳۵۰
GAPDH	Forward: CGGAGTCAACGGATTGGTTCGTAT Reverse: AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	bp۶۰۰

MMP-9: Matrix metalloproteinase-9; MMP-2: Matrix metalloproteinase-2; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase



شکل ۱. تصویر نتایج الکتروفورز محصولات qReal time RT-PCR (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction)

در ژل مرتبط با MMP-۲ (Matrix metalloproteinase-۲) MMP-۹ (Matrix metalloproteinase-۹) و GAPDH (Glyceraldehyde ۳- phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن شاهد می‌باشد. شاهد منفی در ستون سمت راست مشاهده می‌گردد.

بیماری خونریزی بند ناف بود که در بیش از ۸۰ درصد بیماران ثبت شد. به طور کلی، در گروه مورد و شاهد شایع‌ترین یافته‌ی بالینی در بیماران نیز خونریزی از بند ناف بود. آزمایش‌های معمول به منظور آشکارسازی آلودگی فرد با HIV، HBV و HCV در طی بازه‌های زمانی شش ماهه برای همه‌ی بیماران دریافت کننده‌ی خون صورت گرفت و در همه‌ی بیماران منفی گزارش شد. همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که منگوانسفالیت ویروسی یا

یافته‌ها

۴۲ بیمار مبتلا به نقص عامل انعقادی XIII شامل ۲۲ مرد و ۲۰ زن برای مطالعه انتخاب شدند. اطلاعات بالینی این افراد در شکل ۲ آمده است. میانگین سن بیماران در زمان ورود به مطالعه ۱۵/۱ سال (بین ۱۴/۲-۲۵/۰ سال) بود. بیماران به صورت یکسان از نظر سنی و جنسی تقسیم گردیدند. میانگین سن در گروه مورد در زمان وقوع خونریزی مغزی ۳۷ ماه بود. اولین یافته‌ی بالینی مرتبط با

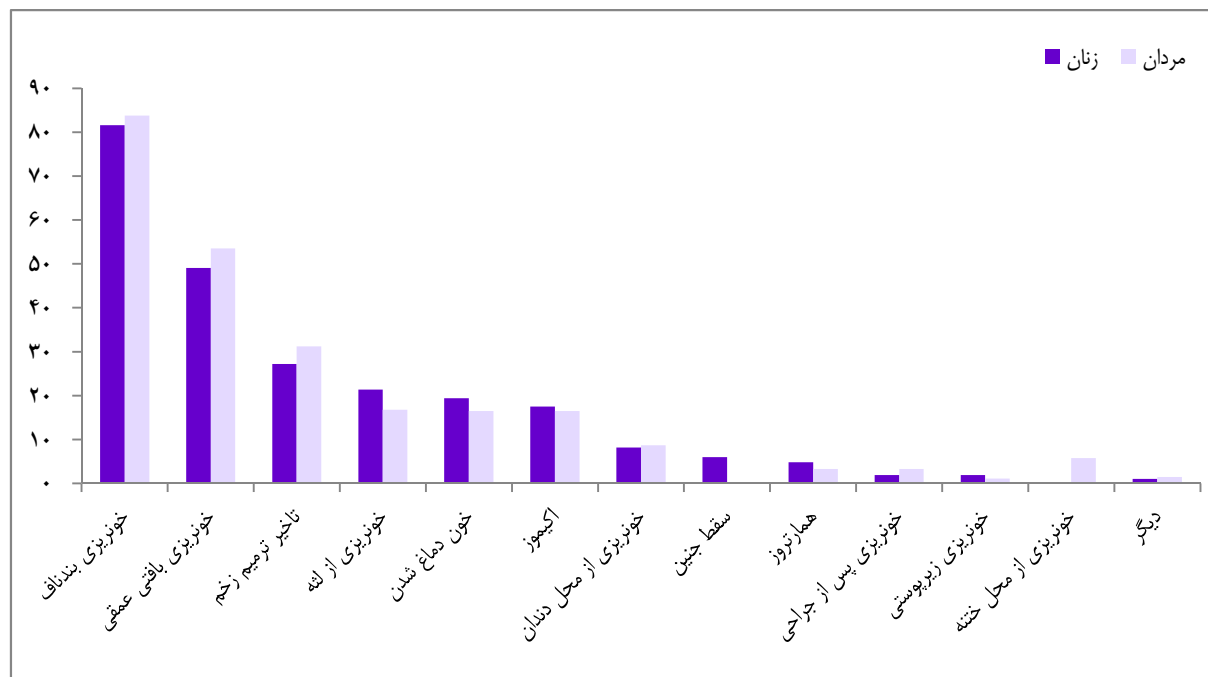
درصد بیماران بود. خونریزی داخل جمجمه‌ای در ۲ بیمار با استفاده از MRI و در ۱۶ بیمار با عکس‌های CTscan تشخیص داده شد. حجم هماتوم در ۸ بیمار بیش از ۳۰ ml، در ۳ بیمار بیش از ۲۰ ml و در ۶ بیمار بین ۱۵-۱۰ ml بود. در همه‌ی بیماران درمان‌های جایگزین تا حداکثر ۲ روز پس از تشخیص خونریزی مغزی به فرد تجویز گردید.

۷۲/۲۲ درصد بیماران گروه مورد، پس از خونریزی مغزی پلاسمای تازه منجمد و ۱۷/۷۸ درصد رسوب کرایو دریافت نمودند و سایر افراد، درمان ترکیبی با کنسانتره‌ی عامل انعقادی XIII با یا بدون همراهی کرایو یا پلازما تزریق شد. پس از درمان بیماران، ۲۷/۳۳ درصد افراد دارای عوارض تشنج بودند. یک بیمار نیز عوارض مرتبط با عقب افتادگی ذهنی و میکرو سفالی داشت؛ در حالی که دیگران به طور تقریبی فاقد عوارض بودند.

منژیته، عامل خونریزی مغزی در بیماران نبوده است. تمام افراد مشارکت کننده در مطالعه بسته به میزان شدت بیماری درمان‌های جایگزین به صورت کنسانتره‌ی عامل XIII (Fibrogammin P) (Behring, Germany) و یا رسوب کرایو دریافت می‌کردند تا از وقوع خونریزی پیشگیری شود.

خونریزی داخل جمجمه‌ای بیماران

در زمان وقوع خونریزی مغزی، بیماران علایم شامل تشنج (۸۳/۳۳ درصد) و تهوع با سردرد (۱۱/۱۱ درصد) را نشان دادند. خونریزی بین بافت‌های پارانشیمی شایع‌ترین نوع خونریزی داخل جمجمه‌ای بود که در ۷۲/۲۲ درصد بیماران رخ داد. سایر اشکال خونریزی مغزی شامل خونریزی Subdural در ۲۲/۲۲ درصد افراد و وقوع همزمان خونریزی بافت بین پارانشیمی و Subdural در ۵/۵۵



شکل ۲. خونریزی‌های ثابت شده در طول زندگی بیماران دچار نقص عامل انعقادی XIII

نتایج آزمایشگاهی

پس از این که مقادیر عددی به دست آمده‌ی mRNA در ژن‌های MMP-۲ و MMP-۹ با توجه به مقادیر عددی GAPDH نرمالیزه گردید، مشاهده شد که مقادیر بالای mRNA ژن MMP-۹ در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (P = ۰/۰۰۱، CI: ۲/۸-۹۵/۳). در حالی که اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن MMP-۲ با وقوع خونریزی مغزی مشاهده نشد. همچنین اختلاف معنی‌دار بین سطح بیان ژن‌های هدف با حجم خونریزی، فراوانی وقوع علائم کلینیکی، جنس، سن، ویژگی‌های نژادی و خونریزی از بافت‌های خاص مشاهده نشد.

بحث

میزان بالای ازدواج‌های فامیلی در استان سیستان و بلوچستان منجر به افزایش شیوع بیماری‌های اتوزوم مغلوب به خصوص بیماری‌های خونریزی دهنده‌ی نادر (Rare bleeding disorder) در این استان در جنوب شرقی ایران شده است. مطالعه‌ی مورد-شاهدی حاضر، تعداد فراوانی از این دسته از بیماران نادر را مورد بررسی قرار داد.

Trinh و همکاران (۱۴)، تمدن و همکاران (۱۵) و همچنین نادری و همکاران (۱۶) مطالعاتی جداگانه بر روی DNA بیماران دچار نقص عامل انعقادی XIII در این منطقه انجام دادند که به ترتیب ۱۴ و ۱۶ بیمار را بررسی کردند. نادری و همکاران اثر پلی‌مورفیسم مهارکننده‌ی فیبرینولیز فعال شونده با ترومبین را بر خونریزی مغزی در جمعیتی از افراد این استان بررسی کردند (۱۶). برای اولین بار، از

روش کمی Real-time reverse transcription-PCR برای اندازه‌گیری کمی نسبی بیان ژن‌های مورد و شاهد در این مطالعه استفاده گردید و اثر تغییرات بیان ژن ماتریکس متالوپروتئینازهای ۹ و ۲ بر خونریزی مغزی در این بیماران بررسی گردید.

مطالعات بالینی نشان از طیف وسیعی از عوارض و نشانه‌های کلینیکی در این دسته از بیماران است که در شکل ۱ نشان داده شده است. درمان پیشگیرانه، نقص عامل انعقادی XIII را (به صورت جایگزینی آن با سایر فرآورده‌ها) جبران می‌نماید؛ به طوری که از وقوع خونریزی‌ها جلوگیری می‌نماید.

با این وجود، هنوز هم ۳۰ درصد بیماران مبتلا به نقص عامل انعقادی XIII دچار خونریزی مغزی می‌شوند؛ به طوری که اولین علت مرگ در این بیماران را موجب می‌شود (۱۷-۱۶). در نهایت، نتایج آزمایشگاهی مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین افزایش سطح بیان ژن MMP-۹ و بیماری‌زایی خونریزی داخل جمجمه‌ای وجود دارد. در سیستم اعصاب مرکزی، نشان داده شده است که ماتریکس متالوپروتئینازهای ۹ و ۲ (ژلاتینازها) باعث تجزیه‌ی اجزای لامینای پایه می‌شوند که به طور ثانویه، منجر به تخریب سد خونی-مغزی می‌شود. اثر ژلاتینازها در سکنه‌ی ایسکمیک مغزی و در خونریزی داخل جمجمه‌ای در مطالعات بسیاری اثبات گردیده است (۱۷).

Abilleira و همکاران اولین بار افزایش بیان ژن غلظت MMP-۹ mRNA را در خون افراد پس از خونریزی مغزی داخل جمجمه‌ای مشاهده نمودند (۱۸). نتایج این مطالعه در تطابق با مطالعات Hernandez-Guillamon و همکاران (۱۸)،

مورد را فراهم می‌کنند. در نهایت، چنین نتیجه‌گیری شد که افزایش بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹، به علت پلی‌مورفیسم یا التهاب مرتبط با بیماری‌زایی خونریزی مغزی در بیماران مبتلا به نقص عامل انعقادی XIII می‌باشد و شاید استفاده از داروهای مهارکننده‌ی ژلاتینازها بتواند باعث کاهش تعداد مرگ و دفعات بستری شدن این بیماران شود

تشکر و قدردانی

این تحقیق، حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد با شماره‌ی طرح ۱۹۲۱۳ و عنوان «بررسی ارتباط بین خونریزی مغزی و بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ۲ در بیماران مبتلا به نقص شدید عامل انعقادی XIII» بوده است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت مالی این پروژه و همچنین از همکاری کارکنان بخش هموفیلی بیمارستان علی ابن ابیطالب زاهدان و مرکز انتقال خون استان سیستان و بلوچستان در اجرای این طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی نمایند.

و همکاران و سایر مطالعاتی است که نشان داده‌اند، افزایش بیان ژن MMP-۹ در ارتباط مستقیم با خونریزی شدید مغزی است (۱۸-۱۹).

ژلاتینازها در تخریب ماتریکس خارج سلولی دخیل هستند که این تخریب، نقشی کلیدی در بروز خونریزی داخل جمجمه‌ای ایفا می‌کند. این نکته می‌بایست ذکر شود که ماتریکس متالوپروتئینازها در انواع عفونت‌ها و التهابات افزایش می‌یابند. بیماران گروه مورد مطالعه در معرض تزریقات مکرر پیشگیرانه‌ی انواع فراورده‌های خونی هستند که ممکن است به علت عفونت در زمان تزریقات یا آلودگی خود فراورده‌ها، افراد را دچار عفونت با ویروس‌ها یا باکتری‌هایی نمایند که به صورت معمول در زمان انتقال خون مورد غربالگری قرار نمی‌گیرند (۲۰).

این عفونت‌ها یا التهابات دیگر به علت تزریق خون، می‌توانند به افزایش شدید سطح بیان ژن ژلاتینازها منجر شوند (۲۱-۲۲). علاوه بر این‌ها، پلی‌مورفیسم‌های فراوانی در ژن‌های MMP وجود دارند که در افزایش سطح بیان ژن‌ها دخیل هستند. این پلی‌مورفیسم‌ها زمینه‌ی مطالعات بیشتر در این

References

1. Dorgalaleh A, Naderi M, Hosseini MS, Alizadeh S, Hosseini S, Tabibian S, Eshghi P. Factor XIII Deficiency in Iran: A Comprehensive Review of the Literature. *Semin Thromb Hemost* 2015. [Epub ahead of print]
2. Naderi M, Imani M, Eshghi P, Dorgalaleh A, Tabibian Sh, Alizadeh Sh, et al. Factor XIII deficiency in Sistan and Baluchistan province. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2013; 10(3): 282-8. [In Persian].
3. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 2011; 91(3): 931-72.
4. Hsieh L, Nugent D. Factor XIII deficiency. *Haemophilia* 2008; 14(6): 1190-200.
5. Schroeder V, Kohler HP. Factor XIII deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(6): 632-41.
6. Lak M, Peyvandi F, Ali SA, Karimi K, Mannucci PM. Pattern of symptoms in 93 Iranian patients with severe factor XIII deficiency. *J Thromb Haemost* 2003; 1(8): 1852-3.
7. Bosche B, Molcanyi M, Noll T, Kochanek M, Kraus B, Rieger B, et al. Occurrence and recurrence of spontaneous chronic subdural haematoma is associated with a factor XIII deficiency. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; 115(1): 13-8.
8. Zhu XL, Chan MS, Poon WS. Spontaneous intracranial hemorrhage: which patients need

- diagnostic cerebral angiography? A prospective study of 206 cases and review of the literature. *Stroke* 1997; 28(7): 1406-9.
9. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2001; 344(19): 1450-60.
 10. Ferro JM. Update on intracerebral haemorrhage. *J Neurol* 2006; 253(8): 985-99.
 11. Manno EM. Update on intracerebral hemorrhage. *Continuum (Minneapolis)* 2012; 18(3): 598-610.
 12. Perez DL, Diamond EL, Castro CM, Diaz A, Buonanno F, Nogueira RG, et al. Factor XIII deficiency related recurrent spontaneous intracerebral hemorrhage: a case and literature review. *Clin Neurol Neurosurg* 2011; 113(2): 142-5.
 13. Todd T, Perry DJ. A review of long-term prophylaxis in the rare inherited coagulation factor deficiencies. *Haemophilia* 2010; 16(4): 569-83.
 14. Trinh CH, Sh EW, Eshghi P, Miri-Moghaddam E, Zadeh-Vakili A, Markham AF, et al. Molecular analysis of sixteen unrelated factor XIII deficiency families from south-east of Iran. *Br J Haematol* 2008; 140(5): 581-4.
 15. Tamaddon GhH, Kazemi A, Rastegar Gh, Alla F, Hejazi Sh. Molecular basis of inherited factor XIII- A deficiency among patients from Sistan - Baluchestan. *Zahedan J Res Med Sci* 2010; 11(4): 19-24. [In Persian].
 16. Naderi M, Dorgalaleh A, Alizadeh S, Kashani Khatib Z, Tabibian S, Kazemi A, et al. Polymorphism of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and risk of intracranial haemorrhage in factor XIII deficiency. *Haemophilia* 2014; 20(1): e89-e92.
 17. Naderi M, Eshghi P, Cohan N, Haghpanah S, Karimi M. Evaluation of the FXIII deficiency prophylaxis intervals in large number of FXIII deficiency patients from Iran. *Haemophilia* 2013; 19(3): e175-e176.
 18. Abilleira S, Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Castillo J, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 2003; 99(1): 65-70.
 19. Hernandez-Guillamon M, Martinez-Saez E, Delgado P, Domingues-Montanari S, Boada C, Penalba A, et al. MMP-2/MMP-9 plasma level and brain expression in cerebral amyloid angiopathy-associated hemorrhagic stroke. *Brain Pathol* 2012; 22(2): 133-41.
 20. Naderi M, Eshghi P, Cohan N, Miri-Moghaddam E, Yaghmaee M, Karimi M. Successful delivery in patients with FXIII deficiency receiving prophylaxis: report of 17 cases in Iran. *Haemophilia* 2012; 18(5): 773-6.
 21. Wang L, Deng S, Lu Y, Zhang Y, Yang L, Guan Y, et al. Increased inflammation and brain injury after transient focal cerebral ischemia in activating transcription factor 3 knockout mice. *Neuroscience* 2012; 220: 100-8.
 22. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21491-4.

Relationship between the Matrix Metalloproteinases and the Occurrence of Central Nervous System Bleeding in Factor XIII Deficiency

Majid Naderi MD¹, Mohammad Reza Younesi MSc², Akbar Dorgalaleh MSc³,
Shaban Alizadeh PhD⁴, Ahmad Kazemi PhD⁵, Shadi Tabibian MSc²,
Zahra Kashani-Khatib MSc⁶

Original Article

Abstract

Background: Matrix metalloproteinase (MMP) has a crucial role in degradation of basal membrane and tissue remodeling and has a possible role in occurrence of central nervous system (CNS) bleeding. Factor XIII deficiency is an extremely rare bleeding disorder with estimated incidence of 1 per 2 million. Since central nervous system bleeding is the main cause of death among these patients, this study aimed to assess to role of MMP-9 and MMP-2 in occurrence of this bleeding in factor XIII deficiency.

Methods: In this case-control study, gene expression of MMP-9 and MMP-2 was determined via quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) assays in 42 patients with factor XIII deficiency that were divided in two groups of with (case) and without central nervous system bleeding (control). Gene expression was compared with comparison method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used for standardization of gene expression.

Findings: Cord bleeding was the most common bleeding episode among all the patients. Overexpression of MMP-9 was observed among 13 patients in case (72.2%) and 3 patients in control group (12.5%) that showed a statistically significant difference ($P = 0.001$, CI95%: 2.8-95.3).

Conclusion: Patients with factor XIII deficiency have a wide spectrum of clinical presentations that has a crucial role in screening and diagnosis of the disease. According to results of this study, overexpression of MMP-9, due to polymorphism or inflammation, had a role in pathogenesis of central nervous system bleeding. Inhibition of MMP-9 may have a role in decreasing the rate of morbidity and mortality among patients with factor XIII deficiency.

Keywords: Factor XIII deficiency, Central nervous system bleeding, Matrix metalloproteinase

Citation: Naderi M, Younesi MR, Dorgalaleh A, Alizadeh Sh, Kazemi A, Tabibian Sh, et al. Relationship between the Matrix Metalloproteinases and the Occurrence of Central Nervous System Bleeding in Factor XIII Deficiency. J Isfahan Med Sch 2015; 32(311): 2025-34

1- Assistant Professor, Department of Pediatrics Hematology and Oncology, Ali Ebn-e Abi Taleb Hospital, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

2- Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences AND PhD Student, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6- Department of Hematology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Shaban Alizadeh PhD, Email: alizadehs@sina.tums.ac.ir

بررسی تأثیر miR-۳۷۲ بر ناپایداری ژنومیکی در ردهی سرطان معده‌ی انسانی MKN-۴۵

ثریا قاسمی^۱، دکتر حسین مزدارانی^۲، دکتر مسعود سلیمانی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان معده، از متداول‌ترین سرطان‌ها در جهان و دومین عامل مرگ انسان در اثر سرطان است. MicroRNAs گروهی از RNAهای درون‌زاد کوچک غیر کدکننده با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید هستند. افزایش بیان miR-۳۷۲ در برخی سرطان‌ها، با کاهش بیان هدف آن (LATS۲) نقش انکومیری دارد. کاهش بیان LATS۲ منجر به عدم تنظیم چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و تکثیر سلولی می‌گردد.

روش‌ها: در این مطالعه، با استفاده از ترانسداکشن لنتی ویروس، بیان miR-۳۷۲ در رده‌ی سلولی MKN-۴۵ افزایش یافت. پس از انتخاب سلول‌های مثبت، میزان بیان miR-۳۷۲ و LATS۲ با تکنیک Real time PCR (Real time polymerase chain reaction)، اندازه‌گیری شد. روش سنجش میکرونوکلئتی، جهت بررسی وجود یا عدم وجود میکرونوکلئتی برای مقایسه‌ی ناپایداری ژنومیکی در سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-۳۷۲ در مقایسه با سلول‌های شاهد، انجام شد.

یافته‌ها: در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد، مقدار بیان miR-۳۷۲ به طور معنی‌داری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ترانسداکشن، به ترتیب ۷/۸۵، ۲۲/۵۰ و ۶۸/۱۱۴ برابر افزایش یافت ($P = ۰/۰۳۰$). بیان LATS۲ در مقایسه با سلول‌های شاهد، در این روزها به ترتیب ۳۹/۰، ۲۹/۰ و ۱۵/۰ برابر کاهش یافت ($P = ۰/۰۱۶$). همچنین، ناپایداری ژنومیکی سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد به میزان معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: در رده‌ی سلولی MKN-۴۵، LATS۲ هدف miR-۳۷۲ است. با افزایش بیان miR-۳۷۲، LATS۲ کاهش بیان می‌یابد. کاهش LATS۲ منجر به ناپایداری ژنومیکی در طی تقسیم سلول و ایجاد میکرونوکلئتی می‌گردد و از این رو، می‌تواند بازدارنده‌ی توموری مهمی در سرطان معده باشد.

واژگان کلیدی: سرطان معده، miR-۳۷۲، LATS۲، ناپایداری ژنومیکی

ارجاع: قاسمی ثریا، مزدارانی حسین، سلیمانی مسعود. بررسی تأثیر miR-۳۷۲ بر ناپایداری ژنومیکی در رده‌ی سرطان معده‌ی انسانی

MKN-۴۵. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۱): ۲۰۴۷-۲۰۳۵

مقدمه

سرطان معده، یکی از متداول‌ترین سرطان‌ها در سطح جهان و دومین عامل مرگ و میر در انسان

است. کارسینوژنز معده، فرایندی چند مرحله‌ای است. هر چند تغییرات ژنتیکی درگیر در شروع و پیشرفت این سرطان، هنوز به خوبی مشخص نیست، اما عوامل

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دچار افزایش و یا کاهش بیان می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد miRNAs مرتبط با مراحل مختلف سرطان معده، در تشخیص زودهنگام این سرطان مؤثر هستند (۱۲-۱۴). miRNAs که به عنوان نشانگرهای زیستی (Biomarkers) برای سرطان معده اثبات و مشخص شده‌اند، دارای پتانسیل‌هایی هستند که ممکن است با دست‌ورزی آن‌ها بتوان در آینده به اثرات درمانی جدید این سرطان دست یافت (۱۵).

miR-372 در بافت‌های طبیعی و سرطانی مختلف، ژن‌های هدف متنوعی دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند، افزایش بیان miR-372 در سلول‌های برخی سرطان‌ها، می‌تواند با تأثیر بر میزان بیان بازدارنده‌ی تومور (LATS2) (Tumor suppressors) (Large tumor suppressor kinase 2)، در برهم زدن تنظیم چرخه‌ی سلولی، تکثیر سلولی و آپوپتوز، نقش انکوئیری (Oncomir) داشته باشد (۲۰-۱۶، ۱۳). LATS2 بازدارنده‌ی توموری است که در عملکرد صحیح سانتروزوم‌ها، القای آپوپتوز، برخی نظارت (Checkpoints)‌های سلولی، تنظیم چرخه‌ی سلولی و حفظ ثبات ژنتیکی سلول در حین تقسیم میتوز، نقش تنظیم کننده دارد (۲۳-۲۱). نقش miR-372 تاکنون در سرطان معده، تنها در مطالعه‌ی Cho و همکاران بررسی شده است. این مطالعه نشان داد رده‌ی سلولی سرطان معده‌ی انسانی AGS نسبت به رده‌های دیگر سرطان معده، بیان بالاتری از miR-372 دارد و از طریق کاهش میزان بیان LATS2 منجر به ویژگی‌های تومورزایی در این رده‌ی سلولی می‌گردد. کاهش miR-372 از طریق ترانسفکشن الیگونوکلوئوتید مکمل آن، میزان پروتئین LATS2 را افزایش می‌دهد و باعث کاهش سرعت رشد سلول‌ها و افزایش

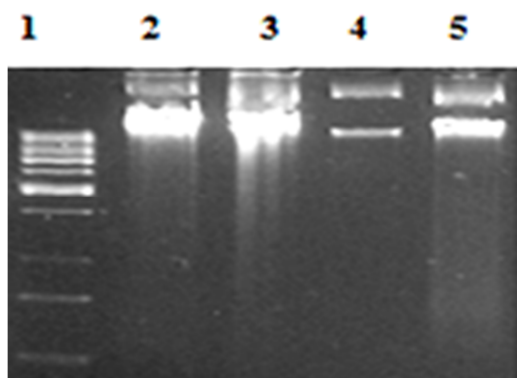
ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی مختلفی برای آن در نظر گرفته‌اند (۱). از زمان شناسایی miRNAs (MicroRNAs)، مشخص شده است که miRNAs نیز از مواردی هستند که در تومورزایی انسان درگیرند. با کشف این موضوع فصل جدیدی از مطالعه جهت شناسایی علل و درمان سرطان‌های انسانی گشوده شده است (۲).

miRNAs، RNAهای درون‌زاد (Endogenesis) و غیر کد کننده با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید هستند (۳-۴). miRNAs می‌توانند به صورت مکمل به توالی مناطق غیر ترجمه شونده (۳'-UTR یا ۳'-Untranslated region) mRNA هدف، متصل گردند و منجر به مهار پس از رونویسی آن گردند (۵-۶). برخی miRNAs در فرایندهای مختلف سرطانی شدن، نقش انکوژنی و برخی نقش بازدارندگی از تومور دارند. miRNAsی که بیان ژن‌های بازدارنده‌ی توموری و یا ژن‌های درگیر در فرایندهای تمایز سلولی را کم می‌کنند و بنابراین با القای تکثیر، رگ‌زایی و تهاجم، منجر به شکل‌گیری تومور می‌گردند، OncomiRs نام دارند. به طور مشابه، miRNAsی که بیان ژن‌های دارای فعالیت انکوژنی را کاهش می‌دهند، miRNAs بازدارنده‌ی تومور نامیده می‌شوند (۷). عملکردهای متنوعی در رابطه با سرطان‌ها برای این دو گروه miR شناخته شده است (۸-۱۰). با استفاده از پروفایل‌های بیانی miRNAs در تومورهای انسانی، به نظر می‌رسد تغییر در بیان طبیعی miRNAs با تشخیص، پیش‌آگهی، مراحل تکامل و پاسخ به درمان در سرطان‌ها مرتبط هستند (۱۱).

مطالعات با استفاده از پروفایل‌های miRNAs نشان می‌دهد که برخی miRNAs در سرطان معده نیز

(*Escherichia coli*) سوش DHF α ، با روش شوک حرارتی و با کمک بافر کلرید کلسیم (1 M) تغییر شکل یافتند. باکتری‌های تغییر شکل یافته، با کشت شبانه، در محیط کشت باکتری جامد حاوی آنتی‌بیوتیک پروکاریوتی مناسب که پلاسمیدها حامل ژن مقاومت آن هستند، تکثیر شدند. از هر پلیت کشت باکتری که حاوی تعداد متعددی کلونی باکتری بود، یک تک کلونی به محیط LB (Lysogeny broth) مایع حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب منتقل شد.

پس از کشت شبانه در انکوباتور شیکردار و با انتقال 500 μ l از محیط کشت حاوی باکتری به 50 ml محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک، باکتری‌ها، جهت کشت شبانه به انکوباتور شیکردار، منتقل گردید. پس از این زمان، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (GeneAll, Korea) پلاسمیدها به صورت جداگانه، استخراج شدند و کمیت و کیفیت آن‌ها با استفاده از میزان جذب نوری و ران نمودن بر روی ژل آگارز تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱. نمونه‌ای از الکتروفورز پلاسمیدهای مورد استفاده در بسته‌بندی ویروس، بر روی ژل آگارز ۱ درصد. 3 μ l از هر پلاسمید به همراه 1 μ l ژل رد ران گردید. از سمت چپ: ۱: نشانگر 1، 2: psPAX γ ، 3: pMD γ .G، 4: Lenti-blank، 5: miR-372 Lenti-

آپتوز در این رده‌ی سلولی می‌گردد (۱۷).

سرطان معده، به جز در مراحل پیشرفته علائم خاصی ندارد. از این رو، شناسایی نشانگرهای زیستی برای تشخیص سریع‌تر این سرطان، گامی اساسی در درمان مؤثرتر این سرطان است (۲۴). در مطالعات مختلف، نقش miR-372 در سایر سرطان‌ها (۱۷-۱۳، ۱۰) و نقش LATS2 در صحت و پایداری ژنومی در سلول‌های فیروپلاستی (۲۳-۲۱) نشان داده شده است.

با توجه به شواهدی که نشان دهنده‌ی شباهت نقش miR-372 در ایجاد برخی ویژگی‌های اختصاصی در مراحل اولیه‌ی سرطان معده، به خصوص سرعت بالای تقسیم سلولی بدون ترمیم ماده‌ی ژنتیکی سلول‌ها است (۲۵، ۱۷) و از آن جا که پیرامون نقش miR-372 در سرطان معده، مطالعه‌ی چندانی صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه آشکارسازی اثر افزایش بیان القایی miR-372 با استفاده از ترانسداکشن لنتی ویروس حامل آن، در رده‌ی سلولی MKN-45 بر بیان LATS2 بود. در این مطالعه، همچنین برای اولین بار، تأثیر افزایش بیان القایی miR-372 بر تغییر در پایداری ژنومیک در رده‌ی سلولی MKN-45 بررسی گردید.

روش‌ها

تهیه‌ی پلاسمیدها

با ترانسفکشن پلاسمیدهای حامل قطعات ژنوم لنتی ویروسی در سلول مناسب جهت بسته‌بندی و ایجاد ذرات ویروسی، ذرات ویروسی بسته‌بندی و تهیه شدند. پلاسمیدهای مورد نیاز در تهیه‌ی ذرات لنتی ویروس (از شرکت Canada, abm) خریداری شدند. پلاسمیدها به صورت جداگانه، در باکتری مستعد *E.coli*

بسته‌بندی لنتی ویروس و ترانسداکشن miR-372

سلول‌های کلیه‌ی جنین انسانی (HEK293T یا Human embryonic kidney)، سلول‌هایی مناسب جهت بسته‌بندی ویروس (Virus packaging) و تهیه‌ی ذرات ویروسی هستند و در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. این رده‌ی سلولی در شرایط کشت در محیط کشت سلولی DMEM;) Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO-BRL) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS یا Fetal bovine serum) (GIBCO-BRL) در پلیت‌های ۱۰ cm در شرایط انکوباتور، با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ °C کشت داده شد. محیط کشت سلول، هر دو روز یک بار تعویض شد. لنتی ویروس با استفاده از ترانسفکشن همزمان سه پلاسمید حامل قطعات مختلف ژنوم لنتی ویروس، با بافر کلسیم فسفات در غلظت و اسیدیته‌ی مناسب، در سلول‌های HEK 293T تهیه شد.

سلول‌های HEK 293T (HEK) پس از کشت و رسیدن به تعداد تقریبی ۵ × ۱۰^۶، که حدود ۷۵ درصد سطح پلیت را پوشش داد، در مرحله‌ی لگاریتمی رشد سلول‌ها، با استفاده از پلاسمید حامل ژن‌های پوششی، pMD2G، پلاسمید بسته‌بندی psPAX2 و پلاسمید حامل miR-372 و نشانگر GFP (Green fluorescent protein) (cat#mh11132) در Lenti Mira-GFP-has-miR-372 vector و در پلیت دیگر به عنوان شاهد با استفاده از پلاسمیدهای psPAX2، pMD2G و پلاسمید شاهد حامل GFP (Lenti GFP-blank vector, cat#m001) به طور جداگانه ترانسفکت گردید. محیط سطح این سلول‌ها، پس از ۲۴ ساعت حاوی ذرات ویروسی خواهد بود.

محیط حاوی ویروس، تا ۷۲ ساعت با فواصل ۲۴ ساعت یک بار، جمع‌آوری گردید. پس از فیلتراسیون، تغلیظ محیط کشت حاوی ویروس انجام شد. با استفاده از PEG ۸۰۰۰ (Polyethylene glycol ۸۰۰۰) و ۱۶ ساعت Shake شدن در دمای ۴ °C و در نهایت سانتریفوژ با دور بالا، پلت ویروسی حاصل شد که در مقدار ۵۰۰ μl محیط کشت سوسپانسیون و در دمای ۷۰ °C-، نگهداری گردید.

سپس با تیتراسیون نمودن، تعداد ذرات ویروسی در واحد حجم تعیین شد. جهت تیتراسیون، ترانسداکشن حجم‌های مشخصی از محیط تغلیظ شده حاوی ویروس در تعداد ۶۰۰۰۰ سلول HEK293T و تعیین درصد تعداد سلول‌های سبز (GFP⁺) با فلوسایتومتری، صورت گرفت. به این ترتیب، با محاسبه‌ی نسبت سلول‌های GFP⁺ و حجم مورد استفاده از محیط حاوی ویروس، تعداد ذرات ویروسی تهیه شده در واحد حجم به دست آمد.

کشت و ترانسداکشن رده‌ی سلولی MKN-45

رده‌ی سلولی سرطان معده‌ی انسانی (MKN-45)، در محیط کشت سلولی (DMEM; GIBCO-BRL) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰ درصد پنی‌سیلین و استپروتومایسین (GIBCO-BRL)، با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ °C در شرایط انکوباتور در فلاسک‌های کشت سلول T25، کشت داده شد. محیط کشت سلول، هر دو روز یک بار تعویض شد. سلول‌ها در صورت نیاز با استفاده از تریپسین_۰/۲۵ EDTA (GIBCO-BRL) از کف ظرف کشت جدا شدند.

جهت به دست آوردن بهترین غلظت استفاده از ویروس جهت ترانسداکشن در این رده‌ی سلولی

این تحقیق را نشان می‌دهد. از زمان ترانسداکشن به مدت ۲۱ روز و با فاصله‌های زمانی ۷ روز یک بار، از سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-372 و لنتی ویروس شاهد و نیز سلول‌های تیمار نشده، با استفاده از RiboEx reagent (GeneAll, Korea) استخراج RNA تمام صورت گرفت. RNA استخراج شده در روزهای ذکر شده، جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت (thermo#K1621) با پرایمر oligo (dT) جهت بررسی میزان تغییرات بیان LATS2 و با استفاده از کیت (Stratagene#60545)، جهت بررسی تغییرات بیان miR-372 استفاده شد. تغییرات بیان LATS2 با استفاده از GAPDH به عنوان شاهد داخلی و کیت (TAKARA#RR820A) و تغییرات بیان miR-372 با استفاده از RNAU6B به عنوان شاهد داخلی و کیت (Stratagene#60545) بررسی شد. Real time PCR در دستگاه ABI Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام شد. بیان نسبی با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بررسی شد.

سنجش میکرونوکلی (MN assay) یا (Micronuclei assay)

سلول‌های ترانسداکت شده و شاهد در فلاسک‌های کشت سلول T25، با $4 \mu\text{g/ml}$ (Sigma) $4 \mu\text{g/ml}$ (۱۰۰ $\mu\text{l}/5\text{ml}$) Cyt-B (Cytochalasin B) به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت سلول، انکوبه شدند. پس از این زمان، سلول‌ها از ظروف کشت با استفاده از تریپسین-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) محصول برداری شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS (Phosphate buffered saline) سرد و سانتریفیوژ نمودن آن‌ها به مدت ۵ دقیقه در

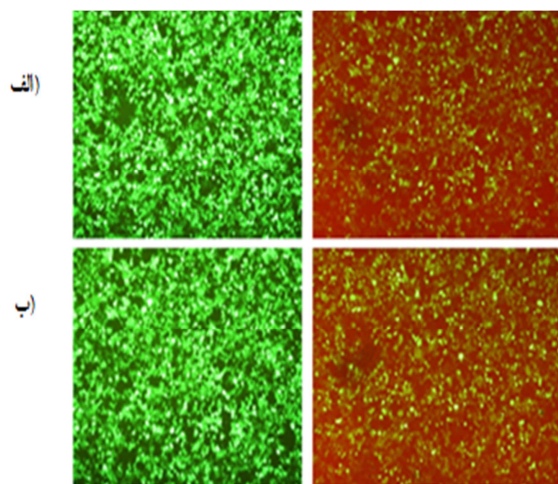
(MOI یا Multiplicity of infection)، 20000 سلول در تعدادی چاهک از یک پلیت ۴۸ خانه کاشته شد. غلظت‌های مختلف ویروس با ۳، ۵ و ۱۰ برابر تعداد سلول‌های کاشته شده در هر چاهک، به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۱۶ ساعت از ترانسداکشن، محیط حاوی ویروس، از سطح سلول‌ها با محیط کشت تازه، تعویض شد. سلول‌ها جهت بررسی مورفولوژی و میزان GFP^+ بودن توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت مشاهده شدند و مناسب‌ترین میزان ویروس جهت ترانسداکشن این رده‌ی سلولی انتخاب شد.

جهت افزایش کارایی ترانسداکشن $2 \mu\text{g/ml}$ Hexadimethrine bromide; Sigma- H9268) Polybrene (Aldrich, No. به محیط کشت افزوده شد. ذرات ویروسی حامل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک یوکاریوتی پورومایسین هستند. جهت به دست آوردن رده‌ی سلولی MKN-45، با بیان پایدار و خلوص بالای سلول‌های GFP^+ $2 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک پورومایسین، پس از ۴۸ ساعت از زمان ترانسداکشن، جهت انتخاب سلول‌های GFP^+ استفاده شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real time PCR

جهت Real time PCR (Real time polymerase chain reaction)، با استفاده از سایت primer³PLUS برای cDNA LATS2 و cDNA GAPDH (reaction phosphate) $3'$ -dehydrogenase complementary DNA (Glyceraldehyde) پرایمرهای رفت و برگشت و با استفاده از سایت IDT برای cDNA miR-372 و cDNA RNAU6B پرایمرهای رفت، (پرایمرهای برگشت در کیت تعبیه شده است) طراحی شد. جدول ۱، توالی پرایمرهای طراحی و استفاده شده در

آن جا که پلاسمید حامل miR-372 استفاده شده جهت تهیهی لنتی ویروس حامل ژن پروتئین سبز فلورسنتی (GFP) است، رنگ سبز سلول‌ها (بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها GFP⁺ بود) نشان دهندهی ترانسفکشن صحیح و بسته‌بندی و شکل‌گیری ذرات ویروسی در این سلول‌ها بود (شکل ۲). با تیتراسیون و تعیین درصد میزان GFP⁺ سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت از ترانسداکشن، مشخص شد تعداد ذرات ویروسی در هر میکرولیتر از محیط کشت پس از تغلیظ نمودن، ۱۱۲۵ ذره ویروسی می‌باشد.



شکل ۲. سلول‌های HEK-293T: پس از ۴۸ ساعت از ترانسفورماسیون، با میکروسکوپ فلورسنت رنگ سبز GFP (Green fluorescent protein) در این سلول‌ها مشاهده شد که نشان دهندهی کارآمد بودن ترانسفورماسیون و تولید لنتی ویروس بود. الف) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-372 و ب) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس شاهد

ترانسداکشن لنتی ویروس

کارایی MOIهای مختلف لنتی ویروس برای ردهی سلولی MKN-45 با استفاده میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. با ترانسداکت نمودن

۱۲۰۰ rpm، سلول‌ها در ۰/۰۷۵ M KCl سرد سوسپانسیون شدند و پس از سانتریفیوژ، پلت‌های سلولی در محلول فیکس (۳:۱ متانول: اسید استیک) سوسپانسیون شدند و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق دوباره سانتریفیوژ گردیدند. پس از دو بار شستشو در محلول فیکس دوم (۶:۱ متانول: اسید استیک) و سوسپانسیون نمودن در این محلول، سلول‌ها به یک لام شیشه‌ای تمیز منتقل شدند. سپس سلول‌ها در گیمسای ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشوی گیمسای اضافه با آب و خشک شدن، لام‌ها جهت بررسی هسته‌ها و شمارش هزار سلول دو هسته‌ای در هر گروه سلول و به دست آوردن تعداد سلول‌های دو هسته‌ای حاوی میکرونوکلیای در این میان، با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ استفاده شدند.

سنجش آماری

همه‌ی بررسی‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند. نتایج به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نشان داده شدند. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری نتایج آماری در نظر گرفته شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) بررسی شد.

یافته‌ها

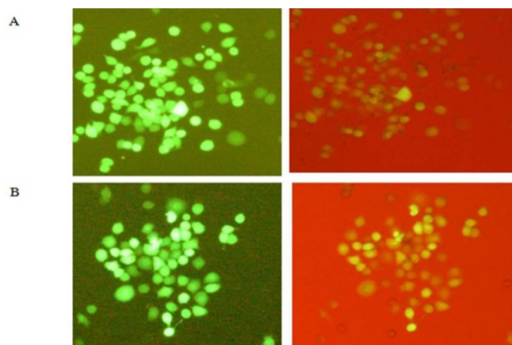
تهیهی پلاسمیدها و بسته‌بندی ویروس در سلول‌های HEK293T

پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌ها، از کیفیت مطلوبی برخوردار بود (شکل ۱). بعد از ۴۸ ساعت از ترانسفکشن پلاسمیدها، سلول‌های HEK293T، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. از

مقدارهای مختلف لنتی ویروس بر این رده‌ی سلولی، مشخص شد بهترین MOI برای این رده‌ی سلولی MOI5 بود؛ به این معنی که ترانسداکشن این رده‌ی سلولی در MOI پایین‌تر از این مقدار، کارایی کمی داشت و درصد اندکی از سلول‌ها GFP⁺ بودند. در MOI بالاتر نیز سلول‌ها مورفولوژی طبیعی خود را از دست دادند و توانایی زنده ماندن چندانی نداشتند. در MOI5، سلول‌ها در شرایط مورفولوژی مساعد بودند و حدود 42 درصد سلول‌ها GFP⁺ بودند. در نهایت، با انتخاب آنتی‌بیوتیکی سلول‌های ترانسداکت شده، با استفاده از پرومایسین، بیش از 90 درصد سلول‌ها، GFP⁺ بودند (شکل 3). کشت این سلول‌ها تا رسیدن به تعداد کافی جهت بررسی‌های بعدی ادامه یافت.

نتایج Real time PCR

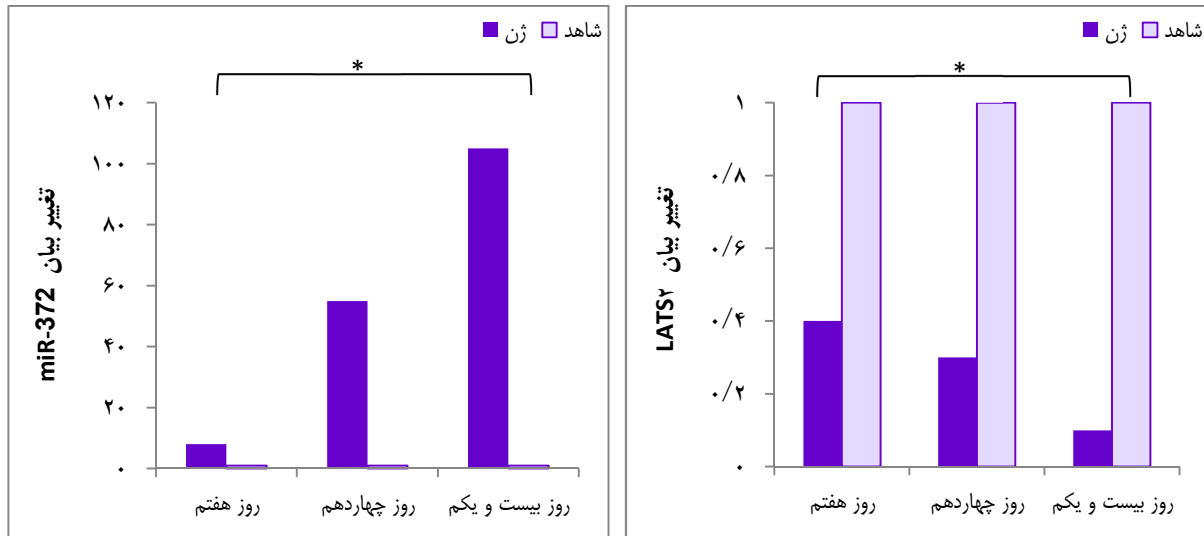
با استفاده از پرایمرهای طراحی شده جهت Real time PCR، Real Time PCR انجام شد (جدول 1). پس از آنالیز اطلاعات حاصل از Real time PCR، نتایج نشان داد که میزان بیان miR-372 در اثر ترانسداکشن افزایش معنی‌داری یافت و در روز 7 به 7/85، در روز 14 به 50/22 و در روز 21 پس از ترانسداکشن، به بیش از 114 برابر سلول‌های شاهد رسید (P = 0/030). افزایش بیان



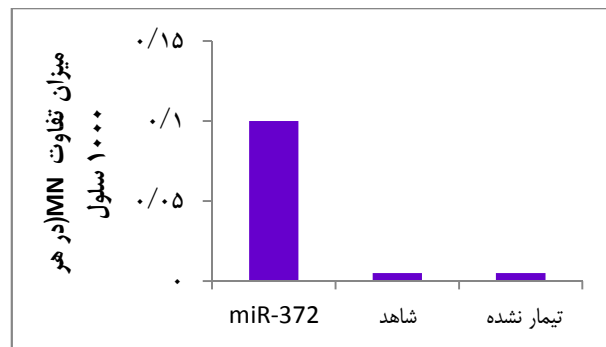
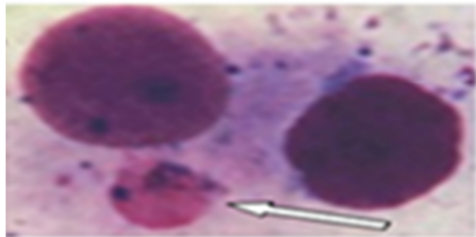
شکل 3. بیش از 90 درصد سلول‌های رده‌ی سلولی MKN-45 پس از انتخاب سلول‌های ترانسداکت شده توسط آنتی‌بیوتیک یوکاریوتی پرومایسین، به صورت ثابت GFP⁺ هستند. (A) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-372 (B) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس شاهد

جدول 1. توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

پرایمر	توالی
LATS2-Forward	5'-CACTCAACTCTGTGACTGGTG-3'
LATS2-Reverse	5'-CCAGTTGATCACCTTCAGC-3'
GAPDH-Forward	5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCG-3'
GAPDH-Reverse	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'
miR-372-Forward	5'-AAAGTGCTGCGACATTTGAG-3'
RNAU6B-Forward	5'-AAATTGGAACGATACAGAGAAG-3'



شکل ۴. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ترانسداکشن، تغییر بیان miR-372 و LATS2 بررسی شد. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید. سطح بیان miR-372 با RNAU6B به عنوان شاهد داخلی طبیعی سازی گردید. هیچ تغییری در میزان بیان miR-372 در گروه آلوده شده با وکتور خالی لنتی ویروسی نسبت به گروه شاهد دیده نشد ($P > 0/050$). سطح بیان LATS2 با GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان شاهد داخلی طبیعی سازی گردید. هیچ تغییری در میزان بیان LATS2 در گروه ترانسداکت شده با وکتور خالی لنتی ویروسی نسبت به گروه شاهد دیده نشد ($P > 0/050$).



شکل ۵. سنجش میکرونوکلئ: سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئ. پیکان میکرونوکلئ را نشان می‌دهد. میزان تفاوت MN (میکرونوکلئ) در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای شمارش شده در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$).

ماده‌ی ژنومیکی بین سلول‌ها و ناپایداری‌های ژنومیکی، سلول‌های دو هسته‌ای حامل میکرونوکلئ خواهند بود.

در این مطالعه، همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای شمارش شده در هر گروه از سلول‌های تیمار شده و سلول‌های شاهد، تفاوت معنی‌داری بین سلول‌های

سنجش میکرونوکلئ

ایجاد میکرونوکلئ در سلول‌های در حال تقسیم، نشان دهنده‌ی ناپایداری ژنومیکی و عدم حفظ ثبات و تقسیم مساوی ماده‌ی ژنتیکی بین دو سلول دختری است. سیتوکالازین B، سیتوکیناز را در چرخه‌ی سلولی میتوزی باز می‌دارد و باعث ایجاد سلول‌های دو هسته‌ای می‌گردد. در صورت عدم تقسیم مساوی

سرطان معده مرتبط هستند، شناسایی زودهنگام آن‌ها به عنوان نشانگر زیستی قابل توجه است (۱۴). در این مطالعه، نقش miR-372 جهت شناسایی ژن هدف و عملکرد مرتبط با آن در سرطان معده در *in vitro* در رده‌ی سلولی MKN-45 برای اولین بار بررسی شد. نقش miR-372 در سرطان‌های مختلفی بررسی و اثبات شده است.

Voorhoeve و همکاران نشان دادند که miR-372 و miR-373 در تومورهای سلول‌های زیای بیضه نقش انکوژنی دارند (۱۶). به علاوه، در مطالعه‌ای بر روی ۱۴۴ بیمار با سرطان روده‌ی بزرگ نیز نشان داده شد که miR-372 به واسطه‌ی کاهش LATS2 منجر به تومورزایی در این سرطان می‌گردد (۱۸).

Belair و همکاران نشان دادند که بیان miR371-3 در عفونت هلیکوباکتر پیلوری کاهش می‌یابد. کاهش miR-372 با افزایش بیان LATS2 مرتبط است (۲۵). miR-372 در مراحل پیشرفت سرطان گلیوما، LATS2 را مورد هدف قرار می‌دهد و با پیشرفت مراحل گلیوما مرتبط است (۳۰). Yu و همکاران نشان دادند که miR-372 یکی از ۵ MicroRNA است که در زنده ماندن بیماران مبتلا به سرطان NSCLC (Non-small cell lung cancer) مؤثر است. بیان LATS2 در بافت‌های مبتلا به سرطان در مقایسه با بافت سالم اطراف، در این بیماران کاهش یافته است (۱۹).

از سوی دیگر، در سرطان‌های کبد و سرویکس مشخص شده است که miR-372 از طریق مسیرهای سیگنالینگ دیگری نقش بازدارندگی از تومور دارد و در سلول‌های این سرطان‌ها نسبت به بافت‌های سالم اطراف کاهش بیان یافته است (۳۱-۳۲). از این رو،

تیمار شده و شاهد حامل میکرونوکلی دیده شد ($P < 0/001$). تفاوت آماری تعداد سلول‌های حامل میکرونوکلی بین سلول‌های ترانسداکت شده‌ی شاهد و ترانسداکت نشده، معنی‌دار نبود.

بحث

نشانگرهای زیستی اختصاصی و بسیار حساس برای تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه بسیار ناکافی هستند. از آن‌جا که بقای بیماران بستگی به مراحل سرطان معده دارد، ضروری است که نشانگرهای زیستی مولکولی برای تشخیص‌های ابتدایی این سرطان و نیز پیشرفت‌های درمانی آن در آینده شناسایی شوند (۲۶). MiRs در شبکه‌های پیچیده‌ی تنظیم بیان ژن‌های مختلف، نقش‌های با اهمیتی دارند (۲۷). miRs کاندیداهای مورد قبولی برای پیشرفت حساسیت تشخیصی نشانگرهای توموری برای مراحل پایین و بنابراین افزایش شانس بقای بیماران سرطانی هستند. مطالعات مختلف، اهمیت آن‌ها را در این زمینه نشان داده است (۲). مطالعات عملکردی miRNAs نیز نشان دهنده‌ی دخالت آن‌ها در فرایندهای مولکولی و زیست‌شناختی منجر شونده به تومورزایی است. در دهه‌ی گذشته، شواهد فراوانی از نقش عدم تنظیم بیان miRs در پاتوژنز و پیشرفت تومورهای انسانی از جمله سرطان معده، منتشر شده است (۲۸). امروزه از miRNAs با عنوان نشانگرهای زیستی جدید سرطان، یاد می‌شود (۲۹).

از طرفی، ارتباط عدم تنظیم miRs با سرطان‌ها پتانسیل بالایی استفاده از آن‌ها به عنوان اهداف درمانی مداخله‌ای را نشان می‌دهند. طبق نتایج تحقیقات قبلی، از آن‌جایی که miRNAs با مراحل مختلف

ممکن است miR-372 در سرطان‌های مختلف نقش‌های متنوعی داشته باشد و مسیرهای سیگنالینگ مختلفی را هدف قرار دهد. از این رو لازم است نقش miR-372 در سرطان‌های مختلف بررسی و مسیر سیگنالینگ آن در هر سرطان مشخص شود. در این مطالعه، مشخص شد که افزایش القایی بیان miR-372 باعث کاهش معنی‌داری در میزان بیان LATS2 در سلول‌های سرطان معده در *in vitro* می‌گردد. این نتیجه نشان داد در سلول‌های سرطان معده همچون برخی سرطان‌های دیگر، miR-372 حداقل یکی از عوامل تنظیم‌کننده‌ی میزان بیان LATS2 است. LATS2 یک پروتئین کیناز مهم در تنظیمات چرخه‌ی سلولی است و عملکرد بازدارندگی از تومور دارد (۱۹-۱۶).

نتایج بررسی تغییرات بیان در این مطالعه، بر روی سلول‌های رده‌ی MKN-45 از سرطان معده، نتایج مطالعه‌ی Cho و همکاران را در رده‌ی سلولی سرطان معده AGS (۱۷) تأیید کرد و نتیجه‌ی مشابهی با سرطان‌های کولون، بیضه و گلیوما داشت (۲۰-۱۶). گروهی از محققین ثابت کردند که رده‌ی سلولی MKN-45 به میزان چشمگیری حاوی سلول‌های CD44⁺ است (۳۳). گلستانه و همکاران نشان دادند که سلول‌های CD44⁺ که بیش از ۹۰ درصد این رده‌ی سلولی هستند، miR-372 را به میزان کمی بیان می‌کنند (۳۴). با توجه به این یافته‌ها، انتخاب این رده‌ی سلولی برای افزایش بیان القایی miR-372 در این مطالعه مناسب است. در این مطالعه، بررسی نقش miR-372 در سرطان معده در *in vitro* نشان داد که بیان القایی بالای miR-372 با استفاده از لنتی ویروس حامل آن در رده‌ی سلولی MKN-45 به

میزان معنی‌داری بیان LATS2 را کاهش می‌دهد. محققین نشان دادند که سلول‌های فیروپلاست جنینی موش *Lats2*^{-/-} نقایص سیتوکینازی افزایش یافته‌ای را نشان می‌دهند. از این رو، تجمع میکرونوکلی، ساتروزوم‌های اضافه و آنیوپلوئیدی در این سلول‌ها افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. بنابراین گمان می‌شود این بازدارنده‌ی توموری، ممکن است نقش مهمی در حفظ صحت میتوزی و یکپارچگی ژنومی داشته باشد. حجیم شدن هسته و چند هسته‌ای شدن، نتایج فقدان LATS2 هستند (۳۵، ۲۳). بیشتر این ویژگی‌ها در سلول‌های برخی سرطان‌ها نیز مشاهده می‌گردد. در مطالعات اخیر مشخص شده است که ناهنجاری‌های ساتروزومی می‌توانند در ایجاد بدخیمی‌ها دخیل باشند. در سلول‌های سرطانی، مورفولوژی‌های ناهنجار هسته‌ای، همچون هسته‌ی حجیم و پلوئیدی، میکرونوکلی و چند هسته‌ای شدن، به عنوان اختلالات ناشی از ناهنجاری‌های ساتروزومی شناخته می‌شوند (۳۶-۳۷، ۲۳).

در این بررسی برای اولین بار، افزایش قابل توجه میکرونوکلی در سلول‌های تیمار شده با لنتی ویروس حامل miR-372 نسبت به سلول‌های شاهد، نشان می‌دهد کاهش بیان بازدارنده‌ی توموری هدف آن (LATS2)، ممکن است نقش مهمی در ناپایداری ژنومی داشته باشد (شکل ۵). این تفاوت ناشی از کاهش میزان بیان LATS2 است که نقش بسیار مهمی در صحت تقسیم ژنومیک در حین تقسیم میتوزی در سلول‌های دختری دارد. با وجود این مشاهدات و نتایج در تومورهای مختلف، گمان می‌رود miR-372 از طریق بازدارندگی بیان LATS2 در پیشرفت سرطان درگیر است (۲۰-۱۶). نتایج این تحقیق نشان

MKN-45 تیمار شده با لنتی ویروس حامل miR-372، باعث افزایش میزان میکرونوکلی (شاخصی از میزان ناپایداری ژنومیکی در سلول‌ها) گردید. احتمال می‌رود این ناپایداری ژنومیکی با تغییرات بعدی در میزان بیان ژن‌های موجود در این مناطق درگیر در ایجاد میکرونوکلی و ناهنجاری‌های کروموزومی حین تقسیمات بعدی میتوز، می‌تواند باعث فرایندهای سلولی بعدی گردد که در نهایت با تومورزایی یا تکامل سرطان معده مرتبط هستند. مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری است.

تشکر و قدردانی

انجام این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفته است. بدین وسیله از مقامات محترم این دانشگاه سپاسگزاری می‌گردد.

می‌دهد که شاید بیان بالای miR-372 در سرطان معده با تأثیری که بر کاهش LATS2 دارد، در ایجاد و افزایش ناپایداری‌های ژنومیکی که از ویژگی‌های اساسی سلول‌های سرطان معده است، نقشی محوری دارد. به طور قطعی، این یافته‌ها احتیاج به بررسی‌های بیشتر برای تأیید نتایج در رده‌های سلولی دیگر سرطان معده، مدل‌های آزمایشگاهی و بافت‌های توموری نسبت به بافت سالم اطراف در بیماران سرطان معده دارد.

نتیجه‌گیری نهایی این که یافته‌های پژوهش حاضر در رده‌ی سلولی MKN-45، نشان داد بیان القایی بالای miR-372 از طریق ترانسداکشن لنتی ویروس حامل آن، منجر به کاهش بیان LATS2 می‌گردد. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که در سرطان معده یا حداقل در آدنوکارسینوما می‌تواند معده که این رده‌ی سلولی از آن مشتق شده است، LATS2 هدف miR-372 می‌باشد. کاهش میزان LATS2 در سلول‌های

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58(2): 71-96.
- Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(3): 470-9.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(1): 23-36.
- Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol* 2011; 3(3): 83-92.
- Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* 2010; 14(4): 236-40.
- Takuno S, Innan H. Evolution of complexity in miRNA-mediated gene regulation systems. *Trends Genet* 2008; 24(2): 56-9.
- Di LG, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med* 2010; 16(6): 257-67.
- Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013; 774: 1-20.
- Wang D, Qiu C, Zhang H, Wang J, Cui Q, Yin Y. Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS One* 2010; 5(9).
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
- Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, et al. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J*

- Oncol 2009; 34(2): 537-42.
13. Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(4): 652-7.
 14. Song MY, Pan KF, Su HJ, Zhang L, Ma JL, Li JY, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PLoS One* 2012; 7(3): e33608.
 15. Yin Y, Li J, Chen S, Zhou T, Si J. MicroRNAs as diagnostic biomarkers in gastric cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13(10): 12544-55.
 16. Voorhoeve PM, le SC, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124(6): 1169-81.
 17. Cho WJ, Shin JM, Kim JS, Lee MR, Hong KS, Lee JH, et al. miR-372 regulates cell cycle and apoptosis of ags human gastric cancer cell line through direct regulation of LATS2. *Mol Cells* 2009; 28(6): 521-7.
 18. Yamashita S, Yamamoto H, Mimori K, Nishida N, Takahashi H, Haraguchi N, et al. MicroRNA-372 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Oncology* 2012; 82(4): 205-12.
 19. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008; 13(1): 48-57.
 20. Stelzer Y, Sagi I, Benvenisty N. Involvement of parental imprinting in the antisense regulation of onco-miR-372-373. *Nat Commun* 2013; 4: 2724.
 21. Visser S, Yang X. LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. *Cell Cycle* 2010; 9(19): 3892-903.
 22. (22) Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev* 2006; 20(19): 2687-700.
 23. Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, et al. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J Biol Chem* 2007; 282(26): 19259-71.
 24. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, et al. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(5): 1672-81.
 25. Belair C, Baud J, Chabas S, Sharma CM, Vogel J, Staedel C, et al. Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell micro RNA cluster to block cell cycle progression. *Silence* 2011; 2(1): 7.
 26. Wang Z, Yang Ch. Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for gastric cancer-opportunities and challenges. *Am J Digest Dis* 2014;1(1): 44-9.
 27. Medina PP, Slack FJ. microRNAs and cancer: an overview. *Cell Cycle* 2008; 7(16): 2485-92.
 28. Liao Y L, Tsai K W, Wen-chang Lin. miRNAs in gastric cancer. In: Lotfy M, editor. *Gastric Carcinoma - Molecular Aspects and Current Advances*. Rijeka, Croatia: Intech; 2011. p. 85-104.
 29. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009; 55(4): 623-31.
 30. Li G, Zhang Z, Tu Y, Jin T, Liang H, Cui G, et al. Correlation of microRNA-372 upregulation with poor prognosis in human glioma. *Diagn Pathol* 2013; 8: 1.
 31. Cairo S, Wang Y, de Reynies A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, et al. Stem cell-like microRNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(47): 20471-6.
 32. Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, Jia WH, Yang Q, Li YX, et al. MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. *J Biol Chem* 2011; 286(29): 25556-63.
 33. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; 27(5): 1006-20.
 34. Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, Shafiee A, Ghaemi N, Soleimani M. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. *Cell Biochem Funct* 2012; 30(5): 411-8.
 35. McPherson JP, Tamblyn L, Elia A, Migon E, Shehabeldin A, Matysiak-Zablocki E, et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO J* 2004; 23(18): 3677-88.
 36. Duensing S. A tentative classification of centrosome abnormalities in cancer. *Cell Biol Int* 2005; 29(5): 352-9.
 37. Salisbury JL, Whitehead CM, Lingle WL, Barrett SL. Centrosomes and cancer. *Biol Cell* 1999; 91(6): 451-60.

The Effect of miR-372 on Genome Instability in MKN-45 Cell Line

Sorayya Ghasemi MSc¹, Hossein Mozdarani PhD², Masoud Soleimani PhD³

Original Article

Abstract

Background: Gastric cancer is one of the most common cancers in the world and the second leading cause of cancer mortality in humans. MicroRNAs are a group of endogenous RNA, small non-coding nucleotides in length of 21-23. Overexpression of miR-372 acts as an oncomir in various types of cancer via down-regulation of its target, LATS2. Down-regulation of LATS2 leads to the loss of cell cycle regulation, apoptosis inhibition, and increased proliferation rate of the cells.

Methods: In this study, we increased the expression of miR-372 with lentivirus transduction inside the GC cell line MKN-45. After selection of positive cells, miR-372 and LATS2 expression levels were measured through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Cytochalasin B blocked (MN) assay was done to verify the presence or absence of MN for comparing genomic instability in treated cells compared to the controls.

Findings: In the treated cells, compared with the controls, the amount of miR-372 expression significantly increased. Fold changes in 7, 14 and 21 days after the transduction were 7.85, 50.22 and 114.68, respectively ($P = 0.030$). In contrast to the control cells, the fold changes of LATS2 expression in these days were 0.39, 0.29 and 0.15, respectively ($P = 0.016$). In addition, compared with control cells, the genomic instability of treated cells increased significantly ($P < 0.001$).

Conclusion: These results indicate that in MKN-45 cell line, LATS2 is a target of miR-372. LATS2 is down-regulated with increased expression of miR-372. Reduce LATS2, leads to genomic instability during cell division and creates micronuclei and hence may be an important tumor suppressor.

Keywords: Gastric cancer (GC), miR-372, LATS2, Genomic instability

Citation: Ghasemi S, Mozdarani H, Soleimani M. **The Effect of miR-372 on Genome Instability in MKN-45 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(311): 2035-47

1- PhD Student, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hossein Mozdarani PhD, Email: mozdarah@modares.ac.ir

راهکار طبابت بالینی پرتودرمانی (رادiotرایی) در سرطان پستان

دکتر شادی بابازاده^۱، دکتر فریبرز مکاریان^۲، دکتر حمید امامی^۳، دکتر نادیا نجفی‌زاده^۱،
دکتر حمیرا حاج احمدیان^۱، دکتر علیرضا عموحیدری^۱، دکتر مهناز رعایایی^۲، دکتر مریم طباطبائیان^۱،
دکتر مهری فقیهی^۱، دکتر مهدی تذهیبی^۳، دکتر الهام معظم^۱، دکتر مهری سیروس^۳

مقاله باز آموزی

چکیده

گروه هدف: متخصصین پرتودرمانی/انکولوژی

اهداف آموزشی

ارتقای آگاهی متخصصین پرتودرمانی/انکولوژی در خصوص اندیکاسیون‌ها و کنترااندیکاسیون‌های انجام پرتودرمانی در مبتلایان سرطان پستان
ارتقای آگاهی متخصصین پرتودرمانی/انکولوژی در خصوص روش انجام پرتودرمانی در انواع مختلف سرطان پستان
ارتقای آگاهی متخصصین پرتودرمانی/انکولوژی در خصوص تناوب معاینات و نحوه پیگیری
ارتقای آگاهی متخصصین پرتودرمانی/انکولوژی در خصوص عوارض درمان و نحوه برخورد با عوارض.

سرفصل‌های اصلی مد نظر در این راهنما به شرح زیر می‌باشند:

- ۱- اندیکاسیون‌ها و کنترااندیکاسیون‌های انجام پرتودرمانی در مبتلایان به سرطان پستان
- ۲- توالی زمانی انجام پرتودرمانی در برابر سایر روش‌های درمانی
- ۳- روش انجام پرتودرمانی در انواع مختلف سرطان پستان
- ۴- تناوب معاینات و نحوه پیگیری
- ۵- عوارض درمان و نحوه برخورد با عوارض.

واژگان کلیدی: پرتودرمانی (رادiotرایی)، سرطان پستان، راهکار طبابت بالینی

ارجاع: بابازاده شادی، مکاریان فریبرز، امامی حمید، نجفی‌زاده نادیا، حاج احمدیان حمیرا، عموحیدری علیرضا، رعایایی مهناز، طباطبائیان مریم، فقیهی مهری، تذهیبی مهدی، معظم الهام، سیروس مهری. **راهکار طبابت بالینی پرتودرمانی (رادiotرایی) در سرطان پستان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۱): ۲۰۴۸-۲۰۵۸

جایگاه بسیار با اهمیتی دارد (۱). مطالعات متعدد بر نقش این روش درمانی در کاهش میزان عود موضعی، افزایش بقا و بهبود کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سرطان پستان صحت گذاشته است (۵-۱).

مقدمه

پرتودرمانی یکی از چهار روش اصلی درمان در سرطان است که در کنار درمان‌های جراحی، شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی در سرطان پستان نیز مانند دیگر انواع آن

۱- مرکز تحقیقات پیشگیری از سرطان، بیمارستان سیدالشهدا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات پیشگیری از سرطان، بیمارستان سیدالشهدا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات پیشگیری از سرطان، بیمارستان سیدالشهدا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

شد و نظرات ایشان تا آن جا که با مرور مطالعات تضادی نداشت، در راهکار مورد نظر اعمال گردید.

کلیات پرتودرمانی در سرطان پستان

قبل از شروع پرتودرمانی پستان، باید CT scan (Computed tomography) قفسه‌ی سینه انجام شود. این اقدام، با هدف تعیین دقیق محل قلب و ریه و محل ضایعه انجام شده که حتی الامکان مانع رسیدن اشعه به بافت‌های حساس می‌شود و حداکثر اشعه‌ی دریافتی به ضایعه (Target volume) را تضمین می‌نماید. دوز درمان به طور معمول، 45-50 gray با اندازه‌ی فراکشن 1/8-2 gray می‌باشد. دوز اشعه‌ی اضافی محدود (بوست یا Boost) به ناحیه‌ی تومور با الکترون یا براکی‌تراپی به صورتی انجام می‌شود که دوز ناحیه‌ی تومور اولیه، به 60-65 gray برسد (۶)

اندیکاسیون‌های انجام پرتودرمانی

بیماران با تشخیص Ductal carcinoma in situ

- اگر بیمار ماستکتومی شده و مارژین جراحی منفی گزارش شده باشد، نیاز به انجام پرتودرمانی نیست (۷-۸).

- اگر بیمار جراحی حفظ پستان (BCS) یا Breast conservative surgery انجام داده است، نیاز به انجام پرتودرمانی دارد. تنها در شرایطی که اندازه‌ی توده کوچک‌تر از 1 cm، مارژین جراحی بیشتر از 1 cm و توده‌ی گرید یک باشد، می‌توان از پرتودرمانی صرف نظر کرد (۹).

- روش پرتودرمانی در این بیماران شامل دادن اشعه به تمام پستان سمت مبتلا است و غدد لنفاوی

نکته‌ی مهم در پرتودرمانی تمام نقاط بدن از جمله پستان، تابش حداکثر میزان اشعه جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی و ممانعت از تابش غیر ضروری به بافت‌های سالم است. با توجه به شکل خاص قفسه‌ی پستان در انسان و وجود ریه، قلب، عروق و اعصاب و مری در این ناحیه، انجام پرتودرمانی سرطان پستان نیازمند به کارگیری تکنیک‌های پیچیده و متعدد است (۱).

پیشرفت روزافزون ابزار و تکنیک‌های انجام پرتودرمانی، بر نقش استفاده از بهترین شواهد بالینی در اتخاذ تصمیم مناسب درمانی جهت بیمار، تأکید می‌کند. مرکز تحقیقات پیشگیری از سرطان دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، تدوین راهکارهای بالینی سرطان پستان را از طریق ارزیابی نقادانه‌ی شواهد بالینی و مرور متون موجود و تطبیق آن بر اساس شرایط جمعیت هدف و منابع استان و اجماع متخصصین و با هدف یکسان‌سازی رویه‌های درمانی در دستور کار قرار داده است که این راهکار از جمله‌ی آن‌ها است.

اساس این راهکار را توصیه‌های ارایه شده در منابع معتبر زیر تشکیل می‌دهد که اغلب در تراز توصیه‌های 2A و 2B قرار می‌گیرد.

۱. Up to date 21

۲. NCCN 2014

۳. Radiation oncology & evidence based medicine

۴. NICE

۵. Evidence based radiation oncology

“Netherland

پیش‌نویس راهکار جهت اظهار نظر به گروهی از متخصصین استان اصفهان در رشته‌های جراحی، هماتولوژی-انکولوژی و پرتودرمانی-انکولوژی ارایه

سوپراکلاویکولر وی باید تحت درمان پرتودرمانی قرار گیرد (۱۴).

- در صورتی که توده‌ی اولیه‌ی پستان در قسمت مدیال یا سنترال باشد، غدد لنفاوی داخلی پستانی نیز نیاز به پرتودرمانی دارد (۹). لازم به ذکر است در این بیماران، دادن بوست به ناحیه‌ی تومور اولیه نیز ضروری است (۱۱).

نکته: بهتر است از جراحان محترم درخواست گردد تا در محل اولیه‌ی تومور، گیره (Clip) مخصوص بگذارند، در غیر این صورت با توجه به محل تومور اولیه در ماموگرافی قبل از عمل، سونوگرافی یا CT scan، منطقه‌ی مورد نظر برای بوست تومور مشخص می‌گردد (۱۶-۱۵).

- اگر تعداد غدد لنفاوی گرفتار در بیماری بیشتر یا مساوی چهار عدد باشد، تمام پستان، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر، زیر بغل و غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر در همان سمت پرتودرمانی می‌شود و بوست به محل تومور اولیه نیز الزامی است (۱۸-۱۷).

- در بیماران با سرطان پستان مهاجم که مورد جراحی رادیکال تعدیل شده (MRM) یا Modified radical mastectomy قرار گرفته‌اند، اگر اندازه‌ی تومور اولیه کمتر از ۵ cm و حاشیه‌ی جراحی بیشتر یا مساوی ۱ mm باشد و بیمار عوامل پیش‌آگهی منفی (مانند درگیری عروق و اعصاب و لنفاتیک، گرید ۳، گیرنده‌ی استروژنی منفی و سن کمتر از چهل سال) وجود نداشته باشد، نیاز به انجام پرتودرمانی نیست (۱۹).

- در صورتی که اندازه‌ی تومور اولیه بزرگ‌تر از ۵ cm باشد، مارژین جراحی کمتر از ۱ mm اما منفی و غدد لنفاوی نیز منفی باشد، در این صورت فقط

درمان نمی‌گردند. دادن دوز اشعه‌ی اضافی محدود (بوست) به ناحیه‌ی تومور اولیه نیاز نیست (۹-۱۰).

بیماران با تشخیص کارسینوم مهاجم (Invasive carcinoma)

- بیماران با تشخیص کارسینوم مهاجم بدون توجه به نوع پاتولوژی (اعم از داکتال، لوبولار، مدولاری موسینوس و ...) در صورتی که جراحی حفظ پستان شده باشند، نیاز به پرتودرمانی دارند (۵) و در تمام این بیماران باید به محل اولیه‌ی تومور نیز بوست داده شود. دادن بوست در این بیماران به وضوح باعث کاهش عود موضعی و افزایش بقا بدون بیماری خواهد شد (۱۱).

نکته‌ی مهم: برای قضاوت در مورد درگیری و یا عدم درگیری غدد لنفاوی زیر بغل و تصمیم‌گیری در مورد انجام درمان تکمیلی، حداقل باید ۸ غده‌ی لنفاوی از زیر بغل خارج گردد (۱۲).

- اگر بیماری سن بالاتر از ۷۰ سال داشته و جراحی حفظ پستان شده باشد، در صورتی که گیرنده‌های استروژن و پروژسترون وی مثبت باشد، اندازه‌ی تومور اولیه کمتر از ۲ cm و گرید ۱ باشد و عوامل پیش‌گویی کننده‌ی نامطلوب (شامل درگیری عروقی، پری‌نوریوم و ...) نداشته باشد، می‌توان وی را تنها هورمون‌درمانی نمود و تحت پیگیری قرار داد. در این بیماران، می‌توان از انجام پرتودرمانی صرف نظر کرد (۱۳).

- اگر در بیماری ۳-۱ غده‌ی لنفاوی زیر بغل مبتلا به سرطان پستان مهاجم باشد و بیمار جراحی حفظ پستان شده باشد، تمام پستان همان سمت، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر و زیر بغل و غدد لنفاوی

- بیماری منتشر که در آن با یک برش نمی‌توان به حاشیه‌ی منفی یا نتایج زیبایی مورد نظر دست یافت.
- حاشیه‌ی جراحی مثبت (۱۰).

کتراندیکاسیون های نسبی

- بیماری‌های Connective tissue فعال که پوست را گرفتار می‌کنند (مانند لوپوس یا اسکرودرما)
- تومورهای با ابعاد بالاتر از ۵ cm (تراز توصیه‌ی ۲B)
- حاشیه‌ی مثبت در یک نقطه
- زنان جوان‌تر از ۳۵ سال با موتاسیون ژن BRCA۱ یا BRCA۲ (۱۰).

عوارض پرتودرمانی

شایع‌ترین عارضه‌ی درازمدت پس از جراحی حفظ پستان و پرتودرمانی شامل ورم بازو و پستان در همان سمت، فیبروز پستان، ماستیت یا میوزیت دردناک، پنومونی و شکستگی دنده است. در برخی موارد در درمان غدد لنفاوی، فیبروز قله‌ی ریه نیز مشاهده می‌شود.

نکته: به طور معمول، لنف ادم ناشی از پرتودرمانی هیچ درمان دارویی ندارد و پاسخ به درمان‌هایی مانند ماساژ یا فیزیوتراپی دائمی نیست.

عوارض پوستی مانند تورم پوست و دردهای عضلانی به خصوص در بیماران مبتلا به بیماری‌های کلاژن واسکولار و یا دیابت بسیار شایع است.

عوارضی مانند فیبروز ریه، براکیال پلکسوپاتی و عوارض قلبی به طور مستقیم بستگی به تکنیک پرتودرمانی و منطقه‌ی درمان شده دارد. در صورت درمان غدد لنفاوی ناحیه‌ی سوپراکلاویکولار به

جدار قفسه‌ی پستان (Chest wall) سمت مبتلا درمان می‌شود و نیازی به درمان غدد لنفاوی نیست. در صورتی که اندازه‌ی تومور اولیه بزرگ‌تر از ۵ cm و مارژین جراحی مثبت باشد، اما غدد لنفاوی زیر بغل درگیر نباشد، فقط جدار قفسه‌ی پستان، غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر و غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر و زیر بغل در همان سمت پرتودرمانی می‌شود (۱۹). اگر توده‌ی اولیه در سمت داخلی یا مرکزی باشد، علاوه بر مناطق پیش‌گفته، غدد لنفاوی داخلی پستانی همان سمت نیز باید درمان گردد (۹).

- در بیمارانی که با تشخیص سرطان پستان مهاجم جراحی MRM شده‌اند، اگر ۱-۳ غده‌ی لنفاوی درگیر داشته باشند، به پرتودرمانی جدار قفسه‌ی پستان، غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر و غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر و زیر بغل در همان سمت نیاز دارند. اگر توده‌ی اولیه در سمت مدیال یا سترال باشد، علاوه بر مناطق پیش‌گفته، غدد لنفاوی داخلی پستانی همان سمت نیز باید درمان گردد (۱۹).

- در بیماران مبتلا به سرطان پستان مهاجم با درگیری بیشتر یا مساوی ۴ غده‌ی لنفاوی، درمان جدار قفسه‌ی پستان، غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر و زیر بغل و غدد لنفاوی داخلی پستانی در همان سمت مبتلا لازم است (۱۹).

کتراندیکاسیون های پرتودرمانی

کتراندیکاسیون مطلق

- پرتودرمانی قلبی به پستان یا قفسه‌ی پستان در همان سمت
- پرتودرمانی در حین بارداری
- کلسیفیکاسیون‌های منتشر بدخیم یا مشکوک

شده است، اولین ماموگرافی ۱۲-۶ ماه پس از تکمیل پرتودرمانی انجام می‌گیرد (تراز توصیه: B۲).

در پیگیری بیماران نیازی به انجام آزمایش‌های کبدی، نشانگرهای تومور، اسکن استخوان، CT scan، PET Scan (Magnetic resonance imaging) MRI (Positron emission tomography) و سونوگرافی به صورت معمول نیست. انجام این اقدامات پاراکلینیک تنها در صورت وجود علائم مشکوک صورت می‌گیرد (۲۴-۲۳).

معاینات در ۲ سال اول هر ۳ ماه یک بار و از سال سوم به بعد هر ۶-۴ ماه انجام می‌گردد (۱۹). آموزش مداوم متخصصین پرتودرمانی در خصوص تکنیک‌ها و روش‌های جدید و پیگیری بیماران همواره مورد تأکید قرار گرفته است (۲۶-۲۵).

خصوصاً اگر دوز درمان در این نواحی بیشتر از ۵۰ gray باشد، احتمال بروز براکیال پلکسوپاتی و فیروز ریه بسیار زیاد است (۲۰).

در تکنیک‌های قدیمی، دوز اشعه برای قلب بالا است و عوارض قلبی در بیماران بیشتر دیده می‌شود، که این نقص در روش‌های جدید پرتودرمانی کاهش قابل توجهی یافته است (۲۱).

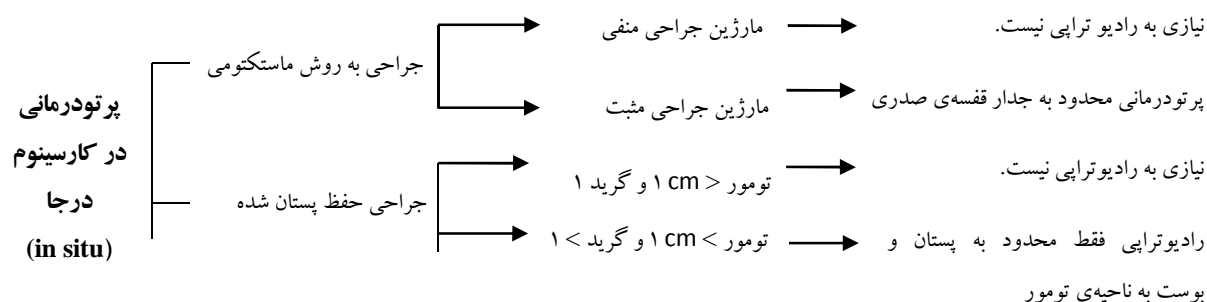
عوارض نادری مانند سرطان ثانویه به دنبال پرتودرمانی نیز وجود دارند که احتمال بروز آن‌ها بسیار اندک است (۲۲).

پیگیری بیمار

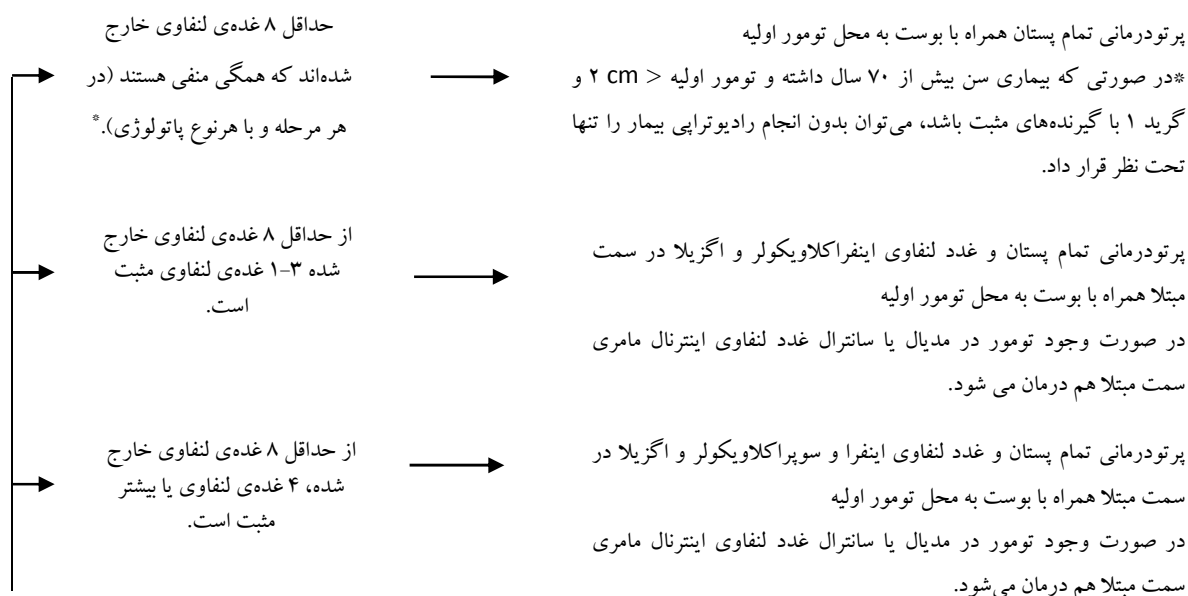
پیگیری بیماران مبتلا به سرطان پستان به صورت معاینات دوره‌ای و با کمک انجام ماموگرافی صورت می‌گیرد (۱۹). در بیماری که جراحی حفظ پستان

پرتودرمانی در جراحی پستان به روش ماستکتومی تعدیل شده





پرتو درمانی در کارسینوم مهاجم با جراحی حفظ پستان



مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره‌ی 290152

References

1. Wood WC, Muss HB, Solin LJ, Olopade OI. Malignant tumors of the breast. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer principle and practice. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2008. p. 1415-77.
2. Haffty BG, Buchholz TA, Perez CA. Early stage breast cancer. In: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, editors. Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins Company; 2013. P. 1175-292.
3. Eaton BR, Losken A, Okwan-Duodu D, Schuster DM, Switchenko JM, Mister D, et al. Local recurrence patterns in breast cancer patients treated with oncoplastic reduction mammoplasty and radiotherapy. Ann Surg Oncol 2014; 21(1): 93-9.
4. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. Lancet 2011; 378(9804): 1707-16.
5. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of

- surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366(9503): 2087-106.
6. Castro PP, Kirova YM, Campana F, Dendale R, Bollet MA, Fournier-Bidoz N, et al. Anatomical, clinical and radiological delineation of target volumes in breast cancer radiotherapy planning: individual variability, questions and answers. *Br J Radiol* 2009; 82(979): 595-9.
 7. Silverstein MJ. An argument against routine use of radiotherapy for ductal carcinoma in situ. *Oncology (Williston Park)* 2003; 17(11): 1511-33.
 8. Gao X, Fisher SG, Emami B. Risk of second primary cancer in the contralateral breast in women treated for early-stage breast cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56(4): 1038-45.
 9. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, Barillot I, et al. Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med* 2001; 345(19): 1378-87.
 10. Moran MS, Bai HX, Harris EE, Arthur DW, Bailey L, Bellon JR, et al. ACR appropriateness criteria(®) ductal carcinoma in situ. *Breast J*. 2012; 18(1): 8-15.
 11. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, Struikmans H, Van den Bogaert W, Fourquet A, et al. Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol* 2007; 25(22): 3259-65.
 12. Chetty U, Jack W, Prescott RJ, Tyler C, Rodger A. Management of the axilla in operable breast cancer treated by breast conservation: a randomized clinical trial. *Edinburgh Breast Unit. Br J Surg* 2000; 87(2): 163-9.
 13. Giordano SH, Hortobagyi GN, Kau SW, Theriault RL, Bondy ML. Breast cancer treatment guidelines in older women. *J Clin Oncol* 2005; 23(4): 783-91.
 14. Wernicke AG, Goodman RL, Turner BC, Komarnicky LT, Curran WJ, Christos PJ, et al. A 10-year follow-up of treatment outcomes in patients with early stage breast cancer and clinically negative axillary nodes treated with tangential breast irradiation following sentinel lymph node dissection or axillary clearance. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125(3): 893-902.
 15. Hunter MA, McFall TA, Hehr KA. Breast-conserving surgery for primary breast cancer: necessity for surgical clips to define the tumor bed for radiation planning. *Radiology* 1996; 200(1): 281-2.
 16. DeBiose DA, Horwitz EM, Martinez AA, Edmundson GK, Chen PY, Gustafson GS, et al. The use of ultrasonography in the localization of the lumpectomy cavity for interstitial brachytherapy of the breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38(4): 755-9.
 17. Vaidya JS, Wenz F, Bulsara M, Tobias JS, Joseph DJ, Keshtgar M, et al. Risk-adapted targeted intraoperative radiotherapy versus whole-breast radiotherapy for breast cancer: 5-year results for local control and overall survival from the TARGIT-A randomised trial. *Lancet* 2014; 383(9917): 603-13.
 18. Recht A, Edge SB, Solin LJ, Robinson DS, Estabrook A, Fine RE, et al. Postmastectomy radiotherapy: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19(5): 1539-69.
 19. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines), version 3. Invasive breast cancer [Online]; [cited 2014]; Available from: URL:http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf
 20. Olsen NK, Pfeiffer P, Johannsen L, Schroder H, Rose C. Radiation-induced brachial plexopathy: neurological follow-up in 161 recurrence-free breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 26(1): 43-9.
 21. Giordano SH, Kuo YF, Freeman JL, Buchholz TA, Hortobagyi GN, Goodwin JS. Risk of cardiac death after adjuvant radiotherapy for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(6): 419-24.
 22. Neugut AI, Weinberg MD, Ahsan H, Rescigno J. Carcinogenic effects of radiotherapy for breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 1999; 13(9): 1245-56.
 23. Khatcheressian JL, Hurley P, Bantug E, Esserman LJ, Grunfeld E, Halberg F, et al. Breast cancer follow-up and management after primary treatment: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31(7): 961-5.
 24. Lu W, de Bock GH, Schaapveld M, Baas PC, Wiggers T, Jansen L. The value of routine physical examination in the follow up of women with a history of early breast cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47(5): 676-82.
 25. Eudaldo T, Huizenga H, Lamm IL, McKenzie A, Milano F, Schlegel W, et al. Guidelines for education and training of medical physicists in radiotherapy. Recommendations from an ESTRO/EFOMP working group. *Radiat Oncol* 2004; 70(2): 125-35.

26. Halkett G, O'Connor M, Aranda S, Jefford M, Shaw T, York D, et al. Pilot randomised controlled trial of a radiation therapist-led

educational intervention for breast cancer patients prior to commencing radiotherapy. *Support Care in Cancer* 2013; 21(6):1725-33.

پرسش‌ها جهت کسب امتیاز بازآموزی

۱- در بررسی غربالگری سالانه‌ی خانم ۴۵ ساله، کانون کلسیفیکاسیون با نمای بدخیم در ربع فوقانی داخلی پستان سمت چپ مشاهده شده است. در گزارش بیوپسی، کارسینوم داکتال درجا مطرح شده است. کدام اقدام درمانی را برای ایشان پیشنهاد می‌کنید؟

- الف) پیگیری با ماموگرافی هر شش ماه
ب) جراحی محدود به خروج توده
ج) ماستکتومی
د) ماستکتومی و پرتودرمانی بستر پستان

۲- در این بیمار (کارسینوم داکتال درجا) روش پرتودرمانی به چه صورت مناسب‌تر است؟

- الف) دادن اشعه به تمام پستان سمت مبتلا و غدد لنفاوی نیز درمان می‌گردند.
ب) دادن اشعه به تمام پستان سمت مبتلا و غدد لنفاوی درمان نمی‌گردند.
ج) دادن اشعه به تمام پستان سمت مبتلا و دادن دوز اضافه به ناحیه‌ی تومور اولیه نیاز است.
د) دادن اشعه به محل ضایعه‌ی اولیه و غدد لنفاوی نیز درمان می‌گردند.

۳- در بیماران مبتلا به سرطان مهاجم، پیشنهاد شما در مورد دادن دوز اضافی (بوست) کدام است؟

- الف) در صورتی که بیمار جراحی حفظ پستان شده باشد، بر اساس نوع آسیب‌شناسی (اعم از داکتال، لوبولار، مدولاری، موسینوس و ...) نیاز به پرتودرمانی دارد.
ب) در بعضی از بیماران باید به محل اولیه‌ی تومور هم بوست داده شود.
ج) دادن دوز اضافی (بوست) باعث کاهش عود موضعی و افزایش بقا بدون بیماری خواهد شد.
د) بیمار بدون توجه به نوع گزارش آسیب‌شناسی (اعم از داکتال، لوبولار، مدولاری موسینوس و ...) در صورتی که جراحی حفظ پستان نشده باشد، نیاز به پرتودرمانی دارد.

۴- در آسیب‌شناسی خانم ۵۰ ساله‌ای، دو غده‌ی لنفاوی زیر بغل درگیر (سرطان پستان مهاجم) می‌باشد و بیمار جراحی حفظ پستان شده است، اقدام بعدی شما کدام است؟

- الف) تمام پستان همان سمت، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر و زیر بغل و غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر وی باید تحت درمان پرتودرمانی قرار بگیرد.
ب) تمام پستان همان سمت وی باید تحت پرتودرمانی قرار بگیرد.
ج) غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر و زیر بغل و غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر وی باید تحت پرتودرمانی قرار گیرد.
د) تمام پستان همان سمت، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر و زیر بغل و غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر و غدد لنفاوی اینترامری وی باید تحت پرتودرمانی قرار بگیرد.

۵- خانم ۴۰ ساله مبتلا به سرطان پستان مهاجم تحت جراحی رادیکال مدیفیه (MRM) قرار گرفته است. در چه صورت نیاز به پرتودرمانی وجود دارد؟

- (الف) اگر اندازه‌ی توده‌ی اولیه کمتر از ۵ cm باشد، حاشیه‌ی جراحی بیشتر یا مساوی ۱ mm باشد.
 (ب) اگر اندازه‌ی توده‌ی اولیه کمتر از ۵ cm باشد و درگیری عروق و اعصاب و لنفاتیک نداشته باشد.
 (ج) اگر اندازه‌ی توده‌ی اولیه کمتر از ۵ cm باشد و گرید ۳، گیرنده‌ی استروژنی منفی و سن کمتر از چهل سال نباشد.
 (د) اگر اندازه‌ی توده‌ی اولیه کمتر از ۵ cm باشد و حاشیه‌ی جراحی کمتر یا مساوی ۱ mm باشد.

۶- کدام از کنترااندیکاسیون مطلق پرتودرمانی در مبتلایان به سرطان پستان نیست؟

- (الف) پرتودرمانی در حین بارداری
 (ب) کلسیفیکاسیون‌های منتشر بدخیم یا مشکوک
 (ج) حاشیه‌ی مثبت در یک نقطه
 (د) بیماری منتشر که در آن با یک برش نمی‌توان به حاشیه‌ی منفی یا نتایج زیبایی مورد نظر دست یافت.

۷- در بیماری که جراحی حفظ پستان شده است، اولین ماموگرافی در چه زمانی صورت می‌گیرد؟

- (الف) بلافاصله پس از تکمیل پرتودرمانی
 (ب) ۳ ماه پس از تکمیل پرتودرمانی
 (ج) ۶-۱۲ ماه پس از تکمیل پرتودرمانی
 (د) بیش از یک سال پس از تکمیل پرتودرمانی

۸- کدام یک جزء اقدامات معمول در پیگیری بیمار مبتلا به سرطان پستان نیست؟

- (الف) ماموگرافی (ب) CT scan (ج) معاینه‌ی فیزیکی (د) معاینه‌ی لگنی

۹- در ادامه‌ی درمان سرطان پستان مهاجم خانم ۷۲ ساله که جراحی حفظ پستان شده باشد، در صورتی که گیرنده‌های استروژن و پروژسترون وی مثبت، اندازه‌ی تومور اولیه کمتر از ۲ cm و گرید ۱ باشد و عوامل پیش‌گویی کننده‌ی نامطلوب (شامل درگیری عروقی، پری نوریوم و ...) نداشته باشد، چه اقدامی را در نظر می‌گیرید؟

(الف) جهت بیمار هورمون درمانی تجویز می‌شود و بیمار تحت پیگیری قرار می‌گیرد.

(ب) در این بیمار، نمی‌توان از انجام پرتودرمانی صرف نظر کرد.

(ج) بیمار را تنها تحت پیگیری قرار می‌دهیم.

(د) بیمار را برای جراحی مجدد معرفی و سپس هورمون‌درمانی می‌کنیم.

۱۰- در بررسی نتایج تصویربرداری و پاتولوژی بیمار مبتلا به کانسر پستان مهاجم که جراحی حفظ پستان شده است، موارد زیر مطرح است:

- توده‌ی ۳ cm در ربع تحتانی داخلی، گرید ۲، با درگیری ۵ غده‌ی لنفاوی از میان ۱۰ غده در ناحیه‌ی زیر بغل، بدون وجود تهاجم لنفی - عروقی. کدام تکنیک درمان در مورد این بیمار صحیح‌تر است؟
- الف) پرتودرمانی تمام پستان همان سمت، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر، زیر بغل و غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر در همان سمت
- ب) پرتودرمانی تمام پستان همان سمت، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر، زیر بغل و غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر در همان سمت و بوست به محل تومور اولیه نیز الزامی است.
- ج) پرتودرمانی تمام پستان همان سمت، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر، زیر بغل و غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر در همان سمت و غدد لنفاوی اینترنال مامری همان سمت و بوست به محل تومور اولیه نیز الزامی است.
- د) تمام پستان همان سمت، غدد لنفاوی اینفراکلاویکولر، غدد لنفاوی سوپراکلاویکولر در همان سمت و غدد لنفاوی اینترنال مامری همان سمت و بوست به محل تومور اولیه نیز الزامی است.

errors author should verify references against the original documents. The Reference should provide the following information as stated in the presented models as follows:

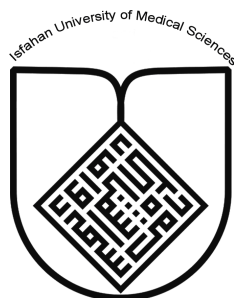
- a. **Article:** Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
 - b. **Chapter in a book:** Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
 - c. **Book:** Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
14. **Proof Reading:** A computer printout is sent to the corresponding author for proof reading before publication in order to avoid any mistakes. Corrections should be marked clearly and sent immediately to the Journal office.
 15. **Abbreviations and symbols:** Use only standard abbreviations. **Avoid using them in the title and abstract.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
 16. The **corresponding author:** Will be supplied with 1 free issue.
 17. **Ethical guidelines:** Ethical considerations must be addressed in the Materials and Methods. Please state that **informed consent** was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project. Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your Institute or agency.
 18. **Conflicts of interest:** Authors must acknowledge and declare any sources of funding and potential conflicting interest, such as receiving funds or fees by, or holding stocks and shares in, an organization that may profit or lose through publication of your paper. Declaring a competing interest will not lead to automatic rejection of the paper, but we would like to be made aware of it.
 19. **Page charges:** There are no charges for publication in this Journal.
 20. **Copyright:** The entire contents of the Journal of Isfahan Medical School are protected under international copyrights. This Journal is for your personal noncommercial use. You may not modify copy, distribute, transmit, display, or publish any materials contained on the Journal without the prior written permission of it or the appropriate copyright owner.
 21. **Peer review process:** All manuscripts are considered to be confidential. They are peer-reviewed by at least 3 anonymous reviewers selected by the Editorial Board. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor decision to accept, reject, or require modifications. If the manuscript is completely acceptable according to the criteria set forth in these instructions, it is scheduled for the next available issue.
 22. Journal has entire right for accept or reject any of received manuscripts.
 23. The editors, editorial board, sponsoring organization, and publisher do not accept responsibility for the statements expressed by authors in their contributions.
 24. **Communicating with the Editorial Office:** We encourage you to communicate with the JIMS Editorial Office and to check on the status of a manuscript via journal site: (<http://journals.mui.ac.ir/jims>) only. For more information you can contact with JIMS office via E-mail address (jims@med.mui.ac.ir).

INSTRUCTION TO AUTHORS

1. **Aims and Scope:** The Journal of Isfahan Medical School is the official scientific **weekly** publication of the Faculty of Medicine in Isfahan Medical Sciences University.
This Journal accepts Original Papers, Review Articles, Case Reports, Short Communications, Educational Medical Video Clips and Letters to the Editor on all aspects of medicine.
2. Manuscript **Submission is acceptable only via Journal URL: <http://journals.mui.ac.ir/jims>**
Manuscript must be accompanied by a covering letter to the Editor-in-Chief, including title and author(s) name and undertaking that it has not been published or submitted elsewhere. In case the manuscript was earlier submitted to some other Journal and was rejected, the authors must provide full information for proper analysis. Manuscript should be typed in double space of the A-4 size paper with clear margins on both sides. The text should be submitted in Microsoft Word format only. Tables as well as illustrations should be typed and drawn on a separate pages. Do not submit tables as photographs.
The figures should be sent in a format of JPEG or GIF which will produce high quality images in the online edition of the journal. Authors must declare that it is being exclusively contributed to the Journal of Isfahan Medical School.
3. The manuscript should include: **Title page**, the **Abstract** (in both Farsi and English), **Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion, Acknowledgement and References**.
4. **The title page:** The complete title of the manuscript, the name of all the authors with their highest qualifications, the department or institution to which they are attached, address for correspondence with telephone numbers, e-mail, and Fax number.
5. The **Abstract:** All original articles must accompany a structured abstract up to 250 words. It should be structured as **Background, Methods, Results and Conclusion** followed by **3 to 5 Keywords**. Keywords will assist indexers in cross indexing the article as they are published with abstract. Use terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of index medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Authors need to be careful that the abstract reflects the content of the article accurately.
6. **Introduction:** This should summarize the purpose and the rationale for the study. It should neither review the subject extensively nor should it have data or conclusions of the study.
7. **Materials & Methods:** This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is used, its manufacturer's name and address should be given in parenthesis. If the method is established, give reference but if the method is new, give enough information so that another author is able to perform it. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. For patients, age, sex with mean age \pm standard deviation must be given. Statistical method must be mentioned and specify any general computer program used.
8. **Results:** It must be presented in the form of text, tables and illustrations. The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion parts) to clarify their contents.
9. **Discussion:** This should emphasize the present findings and the variations or similarities with other work done in the field by other workers. The detailed data should not be repeated in the discussion again. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. It must be mentioned whether the hypothesis mentioned in the article is true, false or no conclusions can be derived.
10. **Acknowledgement:** All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgement section. It should include persons who provided technical help, writing assistance and departmental head who only provided general support. Financial and material support should also be acknowledged.
11. **Tables:** In limited numbers should be submitted with the **captions placed above**. Do not submit tables as photograph. Place explanatory matters in footnotes, not in the heading.
12. **Figures:** Should be in limited numbers, with high quality art work and mounted on separate pages. The captions **should be placed below**. The same data should not be presented in tables, figures and text, simultaneously.
13. **References:** Should be as **Vancouver style**. All manuscripts should be accompanied by relevant references. The author should ensure reference to locally published studies by doing proper literature search. It may not be possible for the editor and reviewers to check the accuracy of all reference citations. To minimize such

Editorial Board (In alphabetical order)

1. **Mojtaba Abtahi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada
3. **Mohammad Esmail Akbari** MD, Professor of Thoracic Surgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. **Reza Amin** MD, Professor of Pediatrics, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. **Babak Amra** MD, Professor of Pulmonology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6. **Saeid Andalib Jortani** MD, Professor of Pathology, Lewis Weil University, USA
7. **Gholam Reza Askari** MD, PhD of Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
8. **Reza Bagherian-Sararoudi** PhD, Assistant Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
9. **Majid Berekatain** MD, Associate Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
10. **Ken Bassett** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
11. **Ahmad Chitsaz** MD, Associate Professor of Neurology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
12. **Afsoon Emami** MD, Associate Professor of Nephrology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
13. **Ali Reza Emami** MD, Associate Professor of Infectious Diseases, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
14. **Shahin Emami** Biochemistry and Endocrinology, Saint Antoine Hospital, France
15. **Ebrahim Esfandiary** MD, PhD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
16. **Faramarz Esmail beigi** MD, Professor of Internal Medicine, School of Medicine, USA
17. **Ziba Farajzadegan** MD, Associate Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
18. **Hamid Fesharaki** Associate Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Marjane Foladi** PhD of Nursing, University of Florida, USA
20. **Aziz Gahari** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
21. **Ali Gheisari** MD, Professor of Cardiovascular Surgery, California, USA
22. **Jafar Golshahi** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
23. **Ali Mohammad Hanjani** MD, Professor of Cardiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
24. **Mina Hasanrezaei** MD, NeuroImmunology, School of Pharmacy, USA
25. **Saied Morteza Heidari** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
26. **Mansour karamooz** MD, Professor of Urology, California, USA
27. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
28. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics & Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
29. **Majid Khazaei** MD, PhD, Associate Professor of Medical Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
30. **Parvin Mahzooni** MD, Associate Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
31. **Majid Maleki** MD, Professor of Cardiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
32. **Mohammad Mardani** MD, Associate Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
33. **Atiye Moghisi** MD, Professor of Endocrinology, Endocrine and Metabolism Research Center, USA
34. **Mehdi Modares** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
35. **Hoshang Moein** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
36. **Fereydoun Nouhi** MD, Professor of Cardiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
37. **Mohammadreza Nourbakhsh** Associate Professor of Physiotherapy, USA
38. **Farzin Pourfarzad** Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands
39. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
40. **Hassan Razmju** MD, Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
41. **Mohammad Reza Safavi** MD, Assistant Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
42. **Reza Rouzbahani** MD, MPH, Assistant Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
43. **Mansour Sholevar** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
44. **Masoud Soheilian** MD, Professor of Ophthalmology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran



JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 32, No. 311, 4th week, January 2015

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

Emerita Editor-in-Chief: **Roya Kelishadi MD**

Editor-in-Chief: **Majid Barekatin MD**

Associate Editor: **Reza Rouzbahani MD, MPH**

Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

E-mail: publications@mui.ac.ir

Office:

P.O. Box 81744-176, Isfahan, I.R. IRAN

Telefax: +98 311 7922291

E-mail: jims@med.mui.ac.ir

Website: <http://www.journals.mui.ac.ir/jims>

Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy edit, Layout edit, Design and Print:

Farzanegan Radandish Co.

P.O. Box 81465-1798, Isfahan, I.R. IRAN

Telefax: +98 311 6686302

E-mail: esfahanfarzanegan@yahoo.com

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexers

- Scopus
- Chemical Abstracts
- Islamic World Science Citation Center (ISC)
- Academic Search Complete EBSCO Publishing databases
- WHO/EMRO/Index Medicus
- Google Scholar
- Index Copernicus
- Directory of Open Access Journal (DOAJ)
- Index Academicus
- Scientific Information Database (www.sid.ir)
- www.iranmedex.com

The online version is available in; IUMS website (www.journals.mui.ac.ir/jims), Iran Publications database (www.magiran.com), Scientific Information Database website (www.sid.ir) and in Health Researchers website (www.iranmedex.com).

Copyright: All rights reserved, no part may be reproduced without the prior permission of the publisher.