

### مقاله های پژوهشی

- ارزیابی خواص ساختاری و رفتار سلولی داربست الکتروریسی شده آلیاژی پلی (هیدروکسی بوتیرات) / کیتوسان به منظور کاربرد در مهندسی بافت غضروف ..... ۱۴۴۱  
 داود صادقی، دکتر سعید کرباسی، دکتر شاهین بنکدار، دکتر شهناز رضوی
- بررسی تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسرول بر آپوپتوز در شکنج دنداندار از تشکیلات هایپوکامپ ..... ۱۴۵۹  
 دکتر علامرضا دشتی، دکتر بهمن رشیدی، دکتر پرهام رئیسی، لیلا راه افروز
- بررسی تأثیر پیش داروی خوراکی آلپرازولام بر کنترل فشار خون بیماران مبتلا به پرفشاری خون حین عمل جراحی ..... ۱۴۶۸  
 دکتر پروین ساجدی، مرتضی رضایی
- افزایش ایمنی زایی ساقه ی پروتئین همگلوپتین و ویروس انفلوانزا در همراهی با پروتئین شوک حرارتی *Leishmania major*.  
 گامی در جهت ساخت واکنش واحد ..... ۱۴۷۵  
 سعیده صادقی نشاط، دکتر بهرخ فرمند، دکتر زهرا کیانمهر، سمیه زمانی، مریم صالح، دکتر فاطمه فتوحی

### نامه به سردبیر

- وضعیت نظام مراقبت بیماری سرخک در کشور ایران در سال ۱۳۹۳ ..... ۱۴۸۷  
 سلمان خزایی، حمید صالحی نیا، رضا پاکزاد، عبدالله محمدیان هفشجانی

### Original Articles

- Evaluation of the Structural Properties and Cellular Behavior of Electrospun Poly(hydroxybutyrate)/Chitosan Blend Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering ..... 1458  
 Davoud Sadeghi MSc, Saeed Karbasi PhD, Shahin Bonakdar PhD, Shahnaz Razavi PhD
- The Effect of Iron and Cholesterol on Neuronal Apoptosis in Dentate Gyrus of Hippocampus in Rabbits Fed with High-Cholesterol Diet ..... 1467  
 Gholam Reza Dashti PhD, Bahman Rashidi PhD, Parham Reisi PhD, Leila Rah-Afrouz
- Cotimparave Evaluation of Oral Alprazolam, as Premedication, on Controlling Blood Pressure in Hypertensive Patients during Surgery ..... 1474  
 Parvin Sajedi MD, Mortaza Rezaie
- Immunogenesis Enhancement of Influenza Virus Stalk Domain Using Leishmania Major Heat Shock Protein, One Step Closer to Universal Vaccine ..... 1486  
 Saeideh Sadeghi Neshat MSc, Behrokh Farahmand PhD, Zahra Kianmehr PhD, Somayeh Zamani MSc, Maryam Saleh MSc, Fatemeh Fotouhi PhD

### Letter to Editor

- The Status of Iran Measles Surveillance System in 2014 ..... 1490  
 Salman Khazaei MSc, Hamid Salehiniya MSc, Reza Pakzad MSc, Abdollah Mohammadian-Hafshejani MSc



## مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۴۹)، بهار اول آبان ۱۳۹۴

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: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۲۹۱

تلفن: ۰۳۱-۳۶۶۹۴۷۳۷

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: ۰۳۱-۳۶۶۸۶۳۰۲

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	استاد، متخصص روانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۳- فرزین پور فرزاد	گروه زیست شناسی 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 نورو ایمنولوژی، 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 آسیب شناسی 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. 15<sup>th</sup> 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. 2<sup>nd</sup> 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. 6<sup>th</sup> 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 عبارات‌های 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:** هیچ گونه 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

ارزیابی خواص ساختاری و رفتار سلولی داربست الکتروریسی شده آلیاژی پلی(هیدروکسی بوتیرات)/کیتوسان به منظور کاربرد در مهندسی بافت غضروف..... ۱۴۴۱

داود صادقی، دکتر سعید کرباسی، دکتر شاهین بنکدار، دکتر شهناز رضوی

بررسی تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج دنداندار از تشکیلات هایپوکامپ..... ۱۴۵۹

دکتر غلامرضا دشتی، دکتر بهمن رشیدی، دکتر پرهام رئیسی، لیلا ره‌افروز

بررسی تأثیر پیش داروی خوراکی آلپرازولام بر کنترل فشار خون بیماران مبتلا به پرفشاری خون حین عمل جراحی..... ۱۴۶۸

دکتر پروین ساجدی، مرتضی رضایی

افزایش ایمنی زایی ساقه‌ی پروتئین هم‌گلوتینین ویروس انفلوانزا در همراهی با پروتئین شوک حرارتی *Leishmania major* گامی در جهت ساخت واکسن واحد..... ۱۴۷۵

سعیده صادقی نشاط، دکتر بهرخ فرهمند، دکتر زهرا کیان‌مهر، سمیه زمانی، مریم صالح، دکتر فاطمه فتوحی

### نامه به سردبیر

وضعیت نظام مراقبت بیماری سرخک در کشور ایران در سال ۱۳۹۳..... ۱۴۸۷

سلمان خزایی، حمید صالحی‌نیا، رضا پاکزاد، عبدالله محمدیان هفشجانی

## ارزیابی خواص ساختاری و رفتار سلولی داربست الکتروسی شده آلیازی پلی(هیدروکسی بوتیرات) / کیتوسان به منظور کاربرد در مهندسی بافت غضروف

داود صادقی<sup>۱</sup>، دکتر سعید کرباسی<sup>۲</sup>، دکتر شاهین بنکدار<sup>۳</sup>، دکتر شهناز رضوی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** دستیابی به داربستی با خواص مطلوب، یکی از چالش‌های پیش روی مهندسی بافت می‌باشد. پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) یا پلی‌هیدروکسی بوتیرات (Polyhydroxybutyrate) پلیمری است که به دلیل داشتن خواص مناسب نظیر زیست‌سازگاری خوب و استحکام مکانیکی بالا در مقایسه با سایر پلیمرها، به تازگی مورد توجه محققین قرار گرفته است. البته، خواصی نظیر آب‌دوستی کم و تردی آن باعث می‌شود تا به صورت خالص برای ساخت داربست مهندسی بافت غضروف مناسب نباشد. از جمله راه‌کارهای حل این مشکل، آلیاژسازی آن با سایر پلیمرهاست. هدف از انجام این پژوهش، تهیه داربست‌های الکتروسی شده آلیازی پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان و بررسی خواص ساختاری و رفتار سلولی آن‌ها بود.

**روش‌ها:** ابتدا محلول‌های پلیمری PHB با استفاده از حلال تری‌فلورواستیک اسید (TFA یا Trifluoroacetic acid) تهیه و الکتروسی شد. پس از بهینه‌سازی پارامترها، جهت بهبود خاصیت آب‌دوستی و استحکام مکانیکی، کیتوسان با درصدهای مختلف به محلول پلیمری اضافه و الکتروسی شد. به منظور ارزیابی داربست‌ها، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی (SEM یا Scanning electron microscope)، آزمون استحکام کششی، آنالیز طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه (FTIR یا Fourier transform infrared)، تعیین زاویه‌ی تماس، و تخلخل‌سنجی استفاده شد. سپس با توجه به نتایج، داربست‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان به عنوان داربست‌های بهینه انتخاب شد و تحت آزمون‌های سلولی با استفاده از سلول‌های کندروسیت خرگوش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که بهترین داربست، از نظر یک‌نواختی قطر الیاف، با استفاده از محلول PHB با غلظت ۹ درصد وزنی و با ولتاژ ۲۱ کیلوولت و در فاصله‌ی ۱۵ سانتی‌متری بین سر سوزن و صفحه‌ی جمع‌کننده به دست می‌آید؛ داربست‌های حاوی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان الیاف یکنواخت‌تری نسبت به داربست ۵ درصد داشتند. با توجه به نتایج سایر آزمون‌ها مشخص شد که نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، از خواص بهینه برخوردارند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنده‌ی چسبندگی مناسب سلول‌های کندروسیت بر روی این داربست‌ها بود.

**نتیجه‌گیری:** با افزودن کیتوسان به PHB می‌توان خواص مکانیکی و بیولوژیک و آب‌دوستی داربست‌های PHB را بهبود بخشید.

**واژگان کلیدی:** مهندسی بافت غضروف، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، کیتوسان، الکتروسی

**ارجاع:** صادقی داود، کرباسی سعید، بنکدار شاهین، رضوی شهناز. ارزیابی خواص ساختاری و رفتار سلولی داربست الکتروسی شده

آلیازی پلی(هیدروکسی بوتیرات)/کیتوسان به منظور کاربرد در مهندسی بافت غضروف. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳

(۳۴۹): ۱۴۵۸-۱۴۴۱

۱- کارشناس ارشد، گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه بیومواد، نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران



## مقدمه

آسیب دیدن و یا از دست رفتن بافت‌های بدن، از جمله بافت غضروف، در اثر عواملی همچون بیماری‌ها و صدمات، یکی از مشکلات مهم سلامت بشری می‌باشد. بافت غضروف به دلیل نداشتن رگ خونی و عصب، دارای خاصیت خود ترمیمی اندکی است و در مواردی که به هر دلیل، آسیبی به آن وارد آید، ضایعه‌ای ماندگار و یا طولانی مدت به جای می‌گذارد که بسته به مورد، باعث ایجاد ناتوانی و یا ساختار و شکل نامتناسب در عضو می‌گردد. در حال حاضر، انواع مختلفی از پیوند غضروف، شامل استفاده از غضروف خود فرد (Autograft)، استفاده از غضروف فرد دیگر (Allograft) و استفاده از بافت غضروبی حیوانات (Xenograft)، جهت درمان آسیب‌های وسیع غضروبی استفاده می‌شود. البته هر کدام از این روش‌ها، در کنار مزایایی که دارند، معایبی نیز دارند که کاربرد آن‌ها را با محدودیت روبه‌رو می‌کند.

مهندسی بافت، رویکردی نوین است که در سال‌های اخیر، به منظور برطرف نمودن این محدودیت‌ها و بازسازی بافت‌های آسیب دیده، مورد توجه قرار گرفته است. طبق تعاریف رایج، مهندسی بافت علمی چند دانشی است که اصول مهندسی و علوم طبیعی را به منظور ساخت و توسعه‌ی جایگزین‌های بیولوژیکی به کار می‌برد تا بافت‌های بدن را ترمیم یا بازسازی کند و یا عملکرد آن‌ها را بازگرداند و یا بهبود بخشد (۱-۳).

مهندسی بافت، شامل رشد دادن سلول‌های خاص درون یک زمینه‌ی برون سلولی (Extracellular matrix) به منظور پدید آوردن

ساختاری مشابه با بافت یا ارگان طبیعی می‌باشد. در این روش، به طور معمول، داربستی سه بعدی به منظور شبیه‌سازی زمینه‌ی برون سلولی طبیعی برای چسبندگی اولیه‌ی سلول‌ها (Initial cell attachment) به سطح، و نیز تکثیر سلولی (Proliferation) استفاده می‌شود (۴).

در مهندسی بافت، سلول‌ها بر روی داربستی سه بعدی کشت می‌شوند که در نهایت، این داربست به طور کامل تخریب می‌شود و بافت جدید جایگزین آن می‌شود. بنا بر این، خطر وجود یک جسم خارجی در محل کاشت و التهابات شدید ناشی از آن از بین می‌رود (۴).

تا کنون بسیاری از پلیمرها و سرامیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان داربست‌های زیست‌سازگار در مهندسی بافت استفاده شده‌اند (۵-۶).

در بین پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری و سازگاری بهتر، همراه با خواص فیزیکی و مکانیکی مناسب، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این گروه پلی‌استری، توسط میکروارگانسیم‌ها به روش‌های متفاوت سنتز و تولید می‌شود (۷-۸). پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) یا Polyhydroxybutyrate)، از جمله پلیمرهای جدید این خانواده می‌باشد که بیشتر مورد توجه مهندسان بافت قرار گرفته است (۹). از جمله مزایای این پلیمر، می‌توان به زیست‌سازگاری به نسبت خوب و استحکام مکانیکی بالا در مقایسه با سایر پلیمرها اشاره نمود، اما در کنار مزایایی که این پلیمر دارد، معایبی نظیر آبدوستی کم و نرخ تخریب پایین آن، باعث محدود شدن کاربرد آن در مهندسی بافت می‌شود (۱۰-۱۱).

مکانیکی و رفتار سلول‌های کندروسیت بر روی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش‌ها

پودر پلی (۳-هیدروکسی بوتیرات) ( $M_w = 300000$ , CAS number = 3-00-26063) با منشأ طبیعی و کیتوسان با وزن مولکولی متوسط و درجه‌ی دی‌استیلاسیون ۷۵-۸۵ درصد از شرکت Sigma Aldrich ایالات متحده‌ی آمریکا خریداری شد. تری‌فلورواستیک اسید با درصد خلوص بیش از ۹۹ درصد و دانسیته‌ی ۱/۴۹ گرم بر میلی‌لیتر از شرکت Carlo Erba خریداری شد. محیط‌های کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) و Ham's F12 از شرکت GIBCO اسکاتلند خریداری شدند.

همچنین، سرم جنین گاوی (FBS) یا (Fetal bovine serum) از شرکت Seromed آلمان تهیه شد. پودر MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) تریپسین، ال-گلوتامین و گلوکارآلدهید نیز از شرکت Sigma Aldrich ایالات متحده‌ی آمریکا خریداری شدند. به منظور طراحی آزمایش‌ها، از نرم‌افزار MiniTab ۱۶ استفاده شد. همچنین، به منظور آنالیز تصاویر، از نرم‌افزار Image J 1.44p استفاده گردید.

ساخت داربست‌های آلیاژی الکتروریسی شده: ابتدا جهت بهینه‌سازی عوامل تأثیرگذار بر خواص داربست‌ها نظیر غلظت، ولتاژ و فاصله، محلول‌های PHB با غلظت‌های مختلف الکتروریسی شد. به این منظور، محلول‌های PHB ساخته شده، بر روی پمپ

تا کنون روش‌های مختلفی برای برطرف نمودن این محدودیت‌ها استفاده شده است؛ که از جمله‌ی آن‌ها، می‌توان به کامپوزیت‌سازی با سرامیک‌های زیست‌فعال، آلیاژسازی با سایر پلیمرها و یا پوشش‌دهی آن‌ها بر روی ساختارهای سرامیکی اشاره نمود. تا کنون، پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مختلفی جهت آلیاژسازی با پلی‌هیدروکسی بوتیرات به منظور برطرف نمودن معایب آن استفاده شده‌اند، اما به طور شاخص، هر کدام باعث برطرف نمودن یکی از معایب PHB شده‌اند. کیتوسان، پلیمری طبیعی و آب‌دوست است که دارای نرخ تخریب به نسبت بالایی است. به نظر می‌رسد آلیاژسازی PHB با کیتوسان راهکاری مناسب جهت برطرف نمودن معایب PHB و بهره‌مندی از خواص مطلوب PHB و کیتوسان می‌باشد.

علاوه بر ترکیب‌بندی شیمیایی داربست مورد استفاده در مهندسی بافت، ساختار آن نیز نقش مهمی در نیل به اهداف مورد نظر ایفا می‌کند. از این رو، داربست‌های الکتروریسی شده به جهت تشابهی که با بافت غضروف دارند، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند.

از این رو، در پژوهش حاضر، داربست‌های الکتروریسی شده‌ی آلیاژی پلی‌هیدروکسی بوتیرات/کیتوسان جهت کاربرد در مهندسی بافت غضروف، مورد بررسی قرار گرفته‌اند. هدف از پژوهش حاضر، بهبود خواص آب‌دوستی و زیست‌تخریب‌پذیری PHB از طریق آلیاژ کردن آن با کیتوسان بود. بدین منظور، از حلال تری‌فلورواستیک اسید (TFA یا Trifluoroacetic acid) به عنوان حلال مشترک PHB و کیتوسان استفاده شد و محلول‌های پلیمری الکتروریسی شد. پس از ساخت داربست‌ها، مورفولوژی، آب‌دوستی، استحکام

همچنین، ولتاژ مناسب نیز ۹ و ۱۳ کیلوولت تشخیص داده شد. مقدار فاصله در محدوده‌ی ۵-۱۵ سانتی‌متر و دبی خروجی در محدوده‌ی ۵ میلی‌لیتر بر ساعت در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که در این قسمت، جهت ساخت نمونه‌ها از طراحی آزمایش توسط الگوریتم Taguchi استفاده شد (جدول ۱).

از روی تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) یا (Scanning electron microscope) نمونه‌ها، مشخص گردید که نمونه‌ی شماره‌ی ۵ یکنواخت‌ترین الیاف را در مقایسه با نمونه‌های دیگر دارد. بنا بر این، به عنوان نمونه‌ی بهینه انتخاب شد. در مرحله‌ی بعد، به منظور بهینه‌سازی بیشتر نمونه‌ی انتخاب شده، محلول ۹ درصد وزنی از PHB، با فواصل و ولتاژهای مختلف (جدول ۲) الکترورسی شد. تصاویر SEM نشان دادند که نمونه‌ی الکترورسی شده با ولتاژ ۲۱ کیلوولت در فاصله‌ی ۱۵ سانتی‌متری، از الیافی یکنواخت‌تر نسبت به بقیه‌ی نمونه‌ها برخوردار است. بنا بر این، همین شرایط به عنوان بهینه‌ترین شرایط برای تولید نمونه انتخاب گردید و درصد‌های مختلف کیتوسان (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) نیز به همین نمونه اضافه گردید و الکترورسی شد (جدول ۳).

تزریق افقی قرار گرفت و سپس به سر سرنگ، سوزن (با قطر گیج ۲۱) وصل و در نهایت قطب مثبت منبع تغذیه، بدان متصل گردید و در روبه‌روی سرنگ نیز ورقه‌ای از فویل آلومینیوم بر روی جمع‌کننده قرار گرفت و قطب منفی منبع تغذیه به آن متصل شد. از آن جایی که جهت تولید یک لایه‌ی بهینه از الیاف یکنواخت می‌بایست پارامترهای متعددی را مورد بررسی قرار داد، قبل از انجام آزمایش‌های اصلی جهت ثابت نگه داشتن بعضی از پارامترها به بررسی آن‌ها پرداخته شد. اثر پارامترها از جمله غلظت، ولتاژ مصرفی، فاصله‌ی نوک سوزن تا جمع‌کننده، در یک سری آزمایش‌های جداگانه بر روی مورفولوژی و قطر الیاف حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

جهت دسترسی به محدوده‌ی مجاز غلظت، قبل از شروع آزمایش از غلظت پایین پلی‌هیدروکسی بوتیرات (۴ درصد وزنی) استفاده شد. در غلظت‌های ۴، ۵، و ۶ درصد وزنی به دلیل پایین بودن ویسکوزیته‌ی محلول ریسیده نمی‌شد. همچنین، امکان حل کردن غلظت‌های بالاتر از ۱۰ درصد وزنی نیز وجود نداشت. بنا بر این، محدوده‌ی ۷-۱۰ درصد وزنی به عنوان محدوده‌ی مناسب در نظر گرفته شد.

جدول ۱. آزمایش‌های طراحی شده با الگوریتم Taguchi و با استفاده از نرم‌افزار MiniTab

شماره نمونه	غلظت محلول PHB (wt.%)	ولتاژ (KV)	فاصله (cm)
۱	۷	۹	۷
۲	۷	۱۳	۱۴
۳	۸	۹	۷
۴	۸	۱۳	۱۴
۵	۹	۱۳	۷
۶	۹	۹	۱۴
۷	۱۰	۱۳	۷
۸	۱۰	۹	۱۴

PHB: Polyhydroxybutyrate

جدول ۲. لیست آزمایش‌های انجام شده بر روی غلظت ۹ درصد وزنی از محلول PHB (Polyhydroxybutyrate) خالص

شماره‌ی نمونه	غلظت PHB (wt.%)	ولتاژ (KV)	فاصله (cm)
۵-۱	۹	۹	۱۱
۵-۲	۹	۱۳	۷
۵-۳	۹	۱۳	۱۵
۵-۴	۹	۱۷	۱۱
۵-۵	۹	۱۷	۱۵
۵-۶	۹	۲۱	۷
۵-۷	۹	۲۱	۱۱
۵-۸	۹	۲۱	۱۵

PHB: Polyhydroxybutyrate

جدول ۳. نمونه‌های حاوی درصدهای مختلف کیتوسان

شماره‌ی نمونه	غلظت PHB (wt.%)	درصد کیتوسان	ولتاژ (KV)	فاصله (cm)
a	۹	۵	۲۱	۱۵
b	۹	۱۰	۲۱	۱۵
c	۹	۱۵	۲۱	۱۵
d	۹	۲۰	۲۱	۱۵

PHB: Polyhydroxybutyrate

اندازه‌گیری دانسیته و تخلخل سنجی نمونه‌ها: جهت اندازه‌گیری دانسیته‌ی داربست‌های الکتروریسی‌شده و تعیین درصد تخلخل آن‌ها، از هر داربست نمونه‌ای با ابعاد ۱ × ۲ سانتی‌متر مربع تهیه شد و با استفاده از ترازو، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، ضخامت نمونه‌ها توسط دستگاه ضخامت‌سنج تعیین شد. سپس با استفاده از فرمول‌های ۱ و ۲، دانسیته و درصد تخلخل نمونه‌ها محاسبه گردید. لازم به ذکر است که برای هر نمونه، سه بار تکرار در نظر گرفته شد و مقادیر اندازه‌گیری شده به صورت میانگین گزارش شد.

(فرمول ۱)

$$\text{دانسیته‌ی داربست} = \frac{\text{جرم داربست}}{\text{ضخامت داربست} \times \text{مساحت داربست}}$$

میکروسکوپ الکترونی روبشی: در این پژوهش، جهت بررسی قطر الیاف و مورفولوژی داربست‌های الکتروریسی‌شده، از هر نمونه ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر مربع آماده گردید و با طلا پوشش‌دهی شد و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی TESCAN مدل VegaII تصاویر مربوط تهیه شدند.

اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس با قطره‌ی آب: این آزمون، جهت تعیین میزان آب‌دوستی نمونه‌ها انجام شد. این آزمون، به صورت دستی انجام شد؛ به این صورت که یک قطره آب دی‌وئیزه روی سطح نمونه قرار داده شد و پس از ۲ ثانیه از قطره عکس گرفته شد. سپس این عکس به وسیله‌ی نرم‌افزار Image J 1.44p آنالیز و زاویه‌ی تماس تماس قطره محاسبه گردید.

(فرمول ۲)

$$\text{درصد تخلخل داربست} = \left( 1 - \frac{\text{دانسیته داربست}}{\text{دانسیته توده‌ای ماده}} \right) \times 100$$

در پتری دیش، مورد آنالیز قرار گرفت. این آنالیز، با استفاده از دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز (Thermo nikolet) در دمای اتاق و نیز در دامنه  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  صورت گرفت.

جداسازی سلول‌های کندروسیت از غضروف مفصلی خرگوش: جهت جداسازی سلول‌های کندروسیت، ابتدا نمونه‌ای از غضروف مفصلی خرگوش جداسازی گردید. سپس به قطعات کوچک تبدیل شد و پس از چندین بار شستشو، با محیط کشت حاوی پنی سیلین-استرپتومایسین، به مدت ۲۴ ساعت تحت تأثیر آنزیم کلاژناز نوع II (۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر، شرکت Invitrogen) قرار گرفت. سپس سوسپانسیون سلولی به دست آمده، سانتریفیوژ شد و سلول‌های جداسازی شده به فلاسک انتقال یافتند.

بررسی چسبندگی سلول‌ها بر روی داربست‌ها: جهت بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی بر روی سطح نمونه‌ها ریخته شد و به مدت چهار ساعت به سلول‌ها اجازه چسبیدن به سطح نمونه‌ها داده شد. سپس جهت تثبیت سلول‌های چسبیده بر روی نمونه‌ها، محلول گلو تار آلدهید ۴ درصد بر روی آن‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه درون یخچال نگهداری شد. سپس سطح نمونه‌ها با (Phosphate buffered saline) PBS شستشو و سریع تخلیه شد و در آخر نیز، جهت از بین بردن نمک‌های باقی مانده از PBS، سطح نمونه‌ها با آب شستشو داده شد و سپس نمونه‌ها با درجات صعودی اتانول آب‌گیری شدند. بعد از آن، سطح نمونه‌ها خشک شدند و به منظور تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی، با طلا پوشش‌دهی شدند.

بررسی خواص مکانیکی: برای انجام این آزمون بر روی نمونه‌های پیش گفته، از دستگاه Instron با لود سل ۵۰ N استفاده شد. به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها جهت قرار دادن در فک دستگاه، ابتدا داربست‌های فیبری با ابعاد  $3 \times 0/5$  سانتی متر مربع تهیه و بر روی قالب مخصوص چسبانده شد. لازم به ذکر است که سرعت کرنش ۱۰ میلی متر در دقیقه در نظر گرفته شد و همچنین، ضخامت نمونه‌ها پس از اندازه‌گیری برای دستگاه تعریف شد و طول و عرض نمونه‌ها به ترتیب ۲ و ۰/۵ سانتی متر تعیین شد. با احتساب این مقادیر، دستگاه اقدام به کشش نمونه‌ها تا نقطه‌ی شکست نمود و نمودار تنش-کرنش آن‌ها رسم و استحکام هر کدام از نمونه‌ها مشخص شد.

طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه (FTIR یا Fourier transform infrared spectroscopy): این روش ابزاری قوی برای کسب اطلاعاتی نظیر بلورینگی و وجود برهم‌کنش‌های خاص در مورد سیستم‌های آلیاژی است. جهت بررسی برهم‌کنش‌های احتمالی بین پلی هیدروکسی بوتیرات و کیتوسان در نمونه‌های آلیاژی، سه نمونه برای این آنالیز تهیه و آماده‌سازی شد. نمونه‌ی اول داربست الکترورسی شده از جنس پلی هیدروکسی بوتیرات خالص بود. نمونه‌ی دوم، داربست آلیاژی حاوی ۲۰ درصد کیتوسان بود. نمونه‌ی سوم کیتوسان بود که به دلیل عدم قابلیت ریسندگی این پلیمر، ابتدا در تری فلورواستیک اسید حل شد و پس از خشک کردن

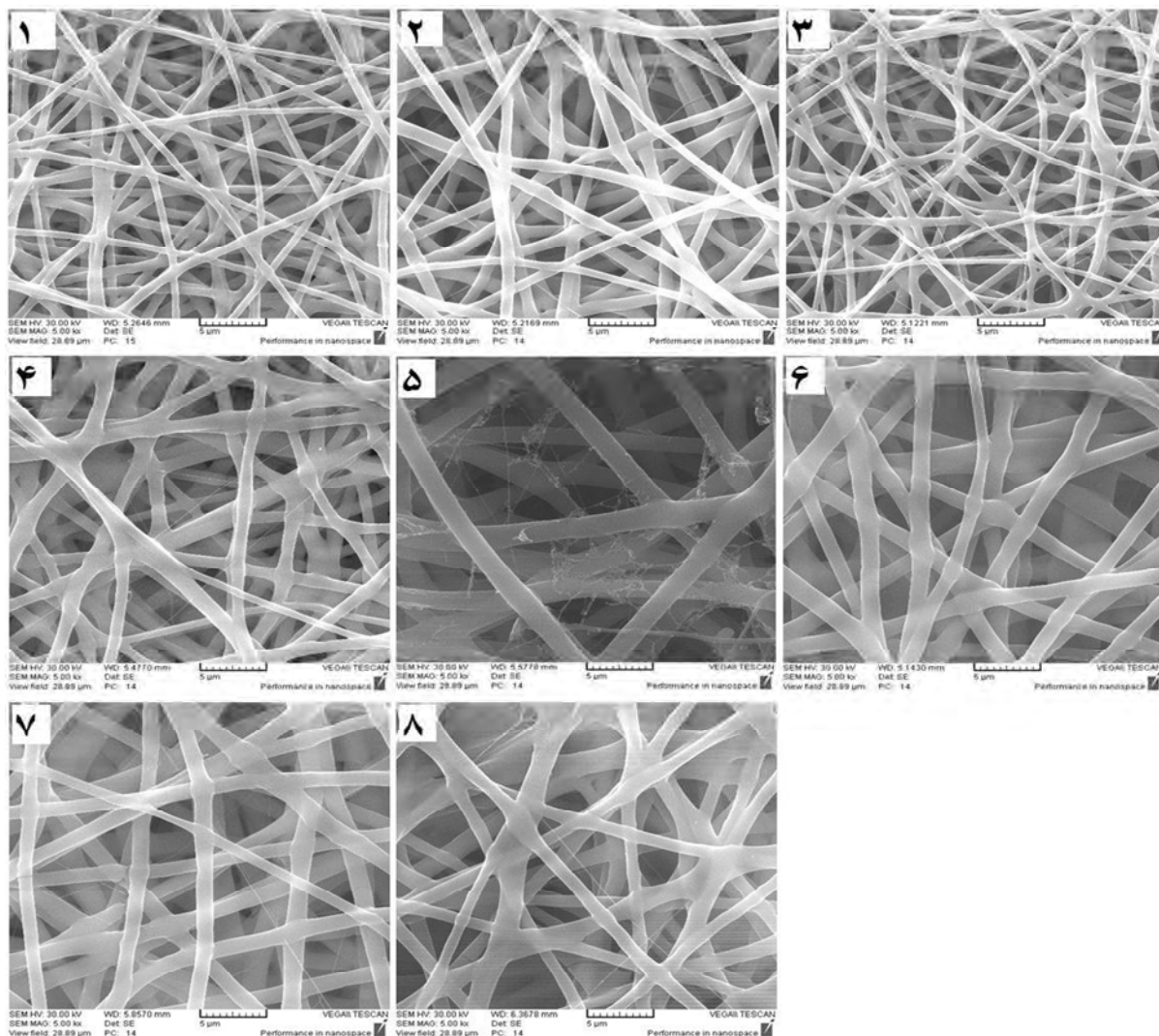
یافته‌ها

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM)

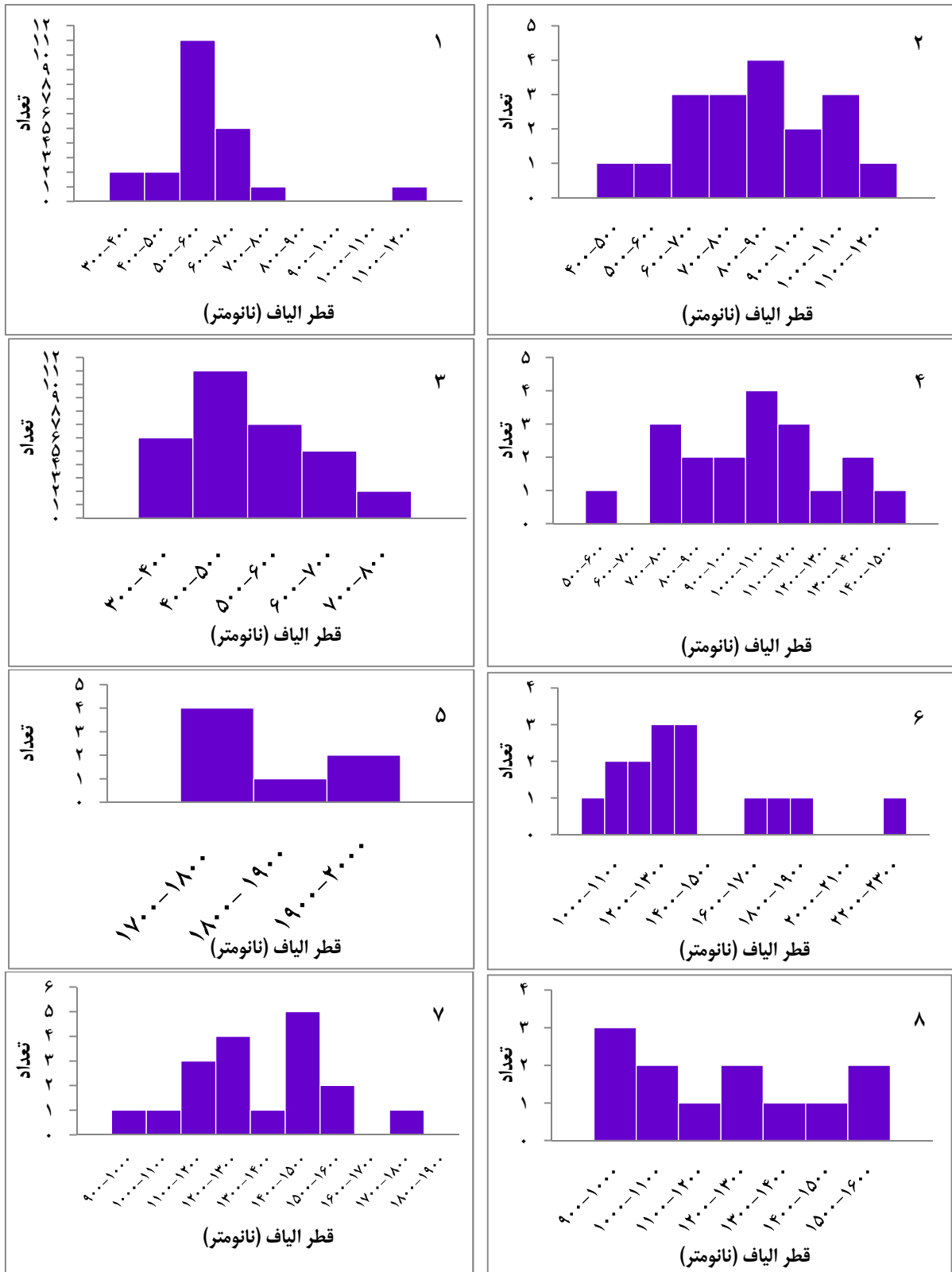
داربست‌های فیبری

قطر الیاف نمونه‌ها آمده است. همان‌طور که در تصاویر مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت محلول پلیمری، الیاف ضخیم‌تری تشکیل شد؛ که این به دلیل افزایش ویسکوزیته‌ی محلول می‌باشد. همچنین، در هر غلظت خاص، با افزایش ولتاژ، میزان یکنواختی الیاف کمتر شد و الیاف با قطر بیشتر به دست آمد.

چنانچه گفته شد، ابتدا محلول‌های PHB با غلظت‌های ۵-۱۰ درصد وزنی با فاصله‌ها و ولتاژهای مختلف الکتروریسی شد. تصاویر این نمونه‌ها در شکل ۱ آمده است. در شکل ۲، اندازه‌ی



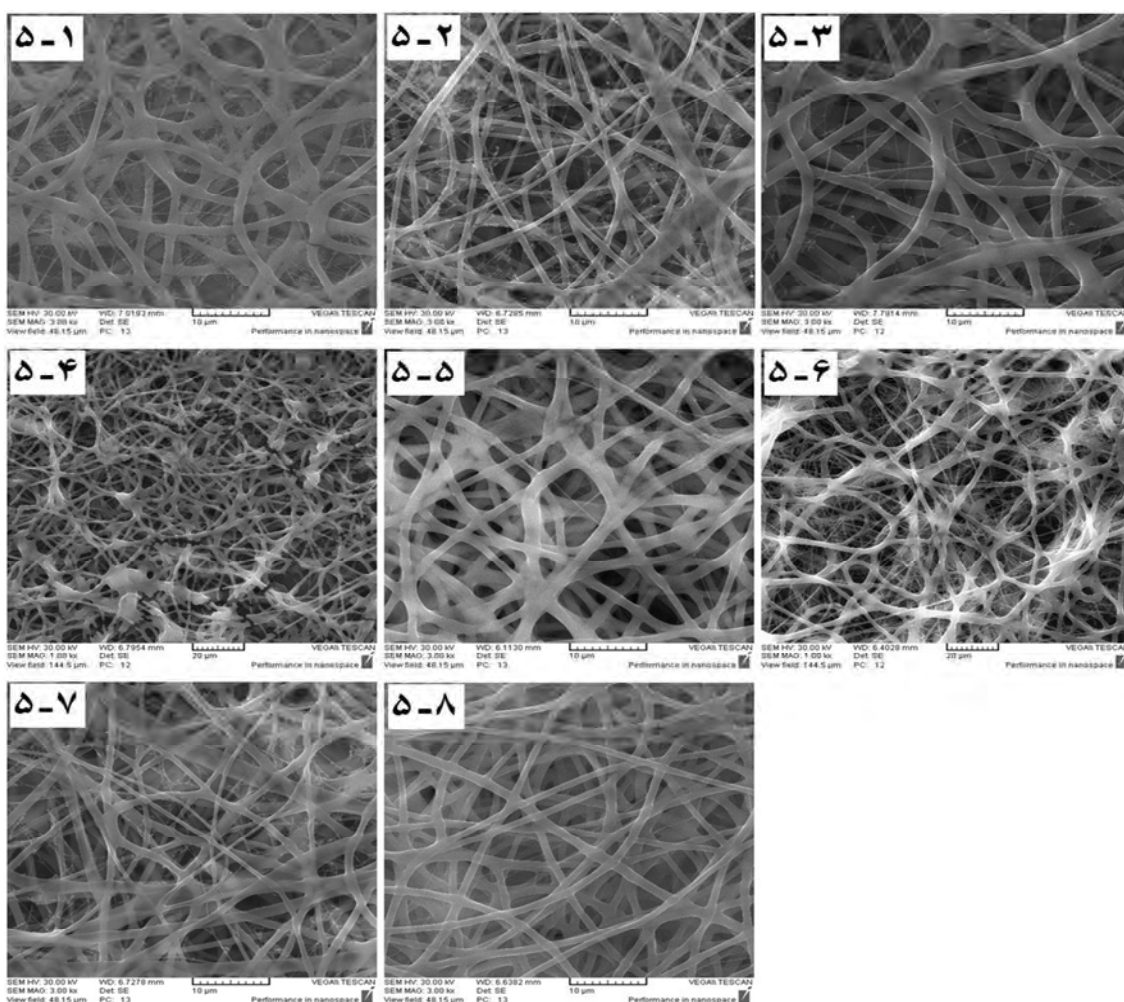
شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نمونه‌های (Polyhydroxybutyrate) PHB خالص طراحی شده با الگوریتم Taguchi: (۱)  $D = 7, V = 9, PHB = 7$  (۲)  $D = 14, V = 13, PHB = 7$  (۳)  $D = 7, V = 9, PHB = 8$  (۴)  $D = 14, V = 13, PHB = 8$  (۵)  $D = 7, V = 13, PHB = 9$  (۶)  $D = 14, V = 9, PHB = 9$  (۷)  $D = 7, V = 13, PHB = 10$  (۸)  $D = 14, V = 9, PHB = 10$



شكل ٢. نمودارهاى مربوط به قطر الياف نمونه‌هاى الكترويسى شده PHB (Polyhydroxybutyrate) خالص: (١)  $D = 7, V = 9$  و  $D = 7, V = 13$  (٢),  $PHB = 7$  و  $D = 14, V = 13$  (٣),  $PHB = 8$  و  $D = 7, V = 9$  (٤),  $PHB = 8$  و  $D = 14, V = 13$  (٥),  $D = 7, V = 13$  و  $PHB = 7$  (٦),  $PHB = 9$  و  $D = 14, V = 0$  (٧),  $PHB = 9$  و  $D = 7, V = 13$  (٨),  $PHB = 10$  و  $D = 14, V = 9$  (٩).

تصاویر نمونه‌های ۱-۵ تا ۸-۵ نیز در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در نمونه‌های ۴-۵ و ۶-۵، علاوه بر الیاف، تعداد زیادی بید هم تشکیل شده است. شاید این پدیده به علت مناسب نبودن فاصله‌ها و ولتاژهای به کار گرفته شده برای الکتروریسی این نمونه‌ها باشد. همچنین، در سایر نمونه‌ها، به جز نمونه‌ی ۸-۵، الیافی غیر همگن به دست آمده است که نشان دهنده‌ی مناسب نبودن پارامترهای الکتروریسی برای غلظت‌های مختلف می‌باشد.

از طرفی، با افزایش فاصله‌ی سر سوزن سرنگ با صفحه‌ی جمع‌کننده نیز قطر الیاف و یکنواختی آن‌ها کاهش یافت. همچنین، با توجه به تصاویر SEM، مشخص شد که در هیچ کدام از نمونه‌ها بید تشکیل نشده است. اما به طور کلی، الیاف به دست آمده در تمامی نمونه‌ها، به جز نمونه‌ی شماره‌ی ۵، از نظر توزیع اندازه، غیر یکنواخت بودند. یکنواخت‌ترین الیاف به دست آمده، مربوط به نمونه‌ی شماره‌ی ۵ بود که الیاف با قطری در حدود ۱/۸۱۱ میکرومتر داشت.

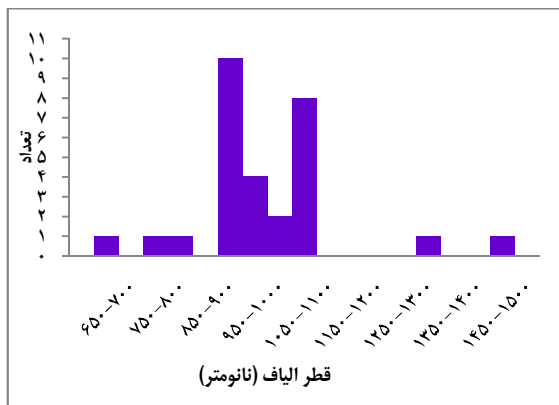


شکل ۳. تصاویر میکروسکوپی الکترونی مربوط به نمونه‌های (Polyhydroxybutyrate) PHB خالص (۹ درصد وزنی) با فاصله‌ها و ولتاژهای مختلف: (۵-۱)  $D = 11, V = 9$  (۵-۲)  $D = 7, V = 13$  (۵-۳)  $D = 7, V = 13$  (۵-۴)  $D = 15, V = 17$  (۵-۵)  $D = 11, V = 17$  (۵-۶)  $D = 15, V = 17$  (۵-۷)  $D = 7, V = 21$  (۵-۸)  $D = 11, V = 21$  (۵-۹)  $D = 15, V = 21$

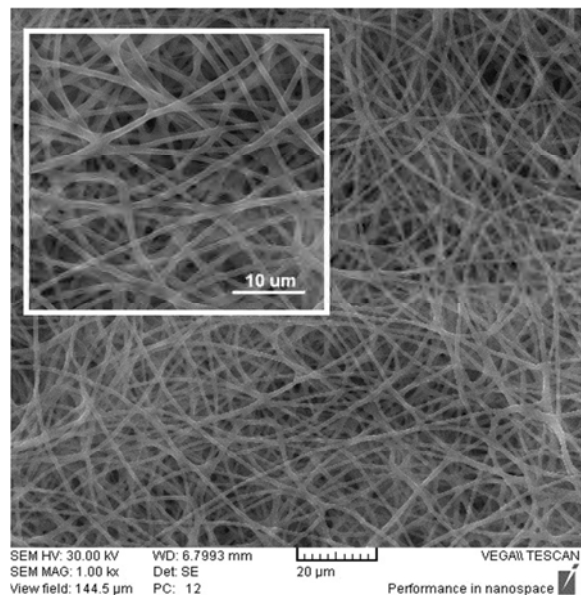


آب‌گریز است. به طور کلی، چنانچه زاویه‌ی تماس برای سطحی بیش از ۷۰ درجه باشد، آن را آب‌گریز و چنانچه زاویه‌ی تماس کمتر از ۷۰ درجه باشد، آن را آب‌دوست می‌گویند. پس از اختلاط این دو پلیمر، انتظار می‌رود آب‌دوستی داربست حاصل بیشتر از PHB خالص باشد. در جدول ۴، زاویه‌ی تماس نمونه‌های مختلف آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش میزان کیتوسان در نمونه‌ها بین ۲۰-۰ درصد، زاویه‌ی تماس نمونه‌ها از ۷۶ درجه که مربوط به داربست PHB خالص است، به ۵۳ درجه می‌رسد که مربوط به نمونه‌ی حاوی ۲۰ درصد کیتوسان است. بنا بر این، همان‌طور که انتظار می‌رفت، با افزودن کیتوسان، آب‌دوستی نمونه‌ها افزایش یافت.

یکنواخت‌ترین الیاف مربوط به نمونه‌ی ۵-۸ می‌باشد که تصویری دیگر از این نمونه در شکل ۴ دیده می‌شود. بنا بر این، نمونه‌ی ۵-۸ به عنوان نمونه‌ی بهینه انتخاب شد و درصدهای مختلف کیتوسان (۲۰-۵ درصد) به آن اضافه گردید. نمودار قطر الیاف نمونه‌ی ۵-۸ در شکل ۵ آمده است که بیانگر یکنواخت بودن الیاف می‌باشد. تصاویر مربوط به نمونه‌های a تا d نیز در شکل ۶ نشان آمده است. همچنان که مشاهده می‌شود، در تمامی نمونه‌ها الیاف به طور تقریبی یکنواخت، تشکیل شده‌اند و بید وجود ندارد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، نمونه‌های حاوی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، الیاف یکنواخت‌تری نسبت به نمونه‌ی حاوی ۵ درصد کیتوسان دارند.



شکل ۵. نمودار توزیع اندازه‌ی قطر الیاف نمونه‌ی ۵-۸



شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به نمونه‌ی ۵-۸ با

دو بزرگ‌نمایی مختلف

### نتایج آزمون زاویه‌ی تماس با قطره‌ی آب

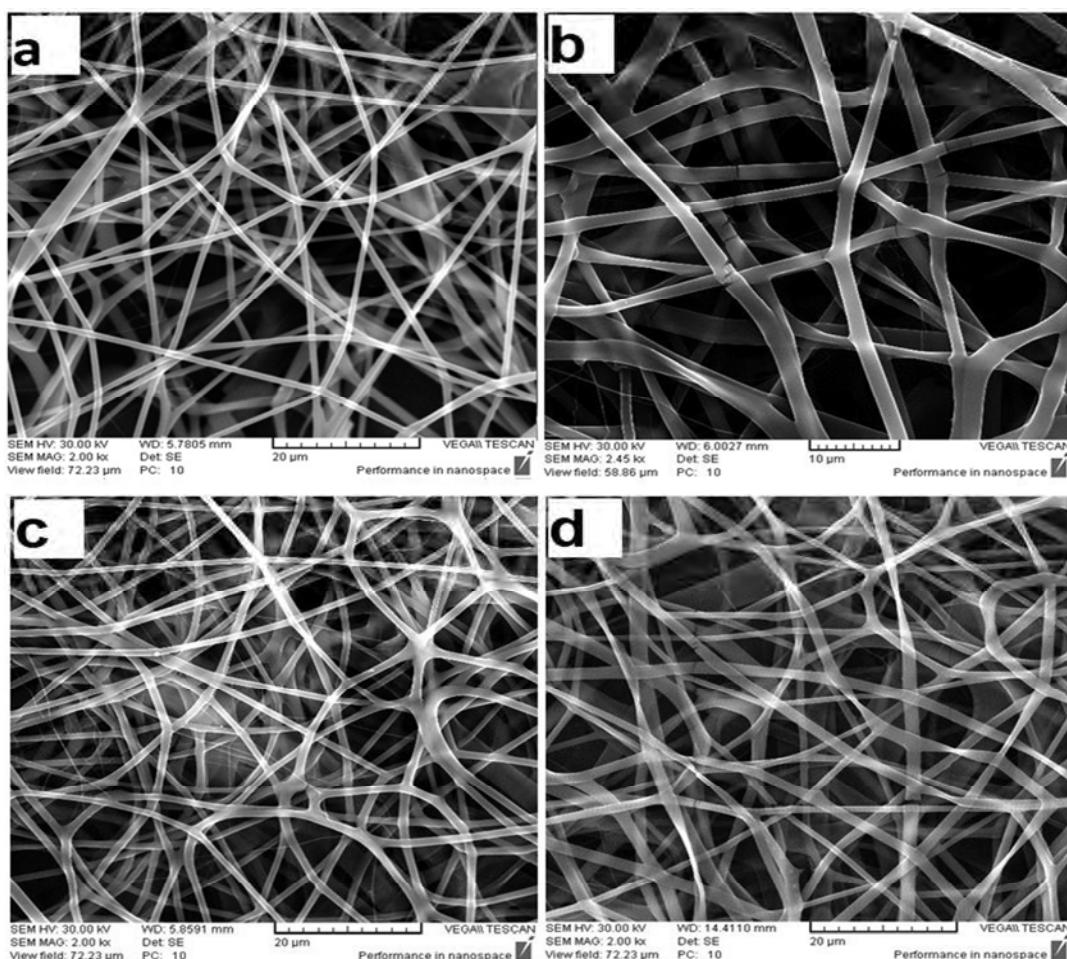
کیتوسان، پلیمری آب‌دوست و PHB پلیمری

### دانسیته و درصد تخلخل داربست‌ها

جهت اندازه‌گیری دانسیته و درصد تخلخل داربست‌ها، ابتدا از هر داربست نمونه‌ای با ابعاد ۲ × ۱ سانتی‌متر مربع تهیه شد و با استفاده از ترازو، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، ضخامت نمونه‌ها توسط دستگاه ضخامت‌سنج

میلی لیتر در نظر گرفته شد (۱۳-۱۲). با استفاده از فرمول‌های ۱ و ۲، دانسیته و درصد تخلخل داربست‌ها محاسبه گردید.

تعیین شد که در جدول ۵ نتایج آن گزارش شده است. همچنین، دانسیته‌ی توده‌ای برای پلیمرهای PHB و کیتوسان، به ترتیب ۱/۲۴ و ۰/۳۰ گرم بر



شکل ۶. تصاویر مربوط به نمونه‌های PHB (Polyhydroxybutyrate) (۹ wt% حاوی) (a) ۵٪ کیتوسان، (b) ۱۰٪ کیتوسان، (c) ۱۵٪ کیتوسان و (d) ۲۰٪ کیتوسان

جدول ۴. زوایای تماس قطره‌ی آب با نمونه‌های بهینه‌سازی شده.

نمونه	زاویه‌ی تماس راست (درجه)	زاویه‌ی تماس چپ (درجه)
PHB	۷۶/۰۶	۷۶/۰۲
a	۶۴/۸۷	۶۵/۰۰
b	۶۳/۹۱	۶۳/۹۸
c	۶۰/۰۱	۵۹/۹۸
d	۵۳/۲۲	۵۳/۰۳

PHB: Polyhydroxybutyrate

جدول ۵. نتایج مربوط به اندازه‌گیری دانسیته و درصد تخلخل داربست‌های الکترورسی شده.

نمونه	وزن نمونه (گرم)	ضخامت (میلی‌متر)	مساحت (میلی‌تر مربع)	درصد تخلخل (%)	دانسیته‌ی داربست (گرم بر میلی‌لیتر)	دانسیته‌ی توده‌ای (گرم بر میلی‌لیتر)
PHB	۲/۴۹۷	۰/۵۴	۲۰	۸۱/۳۵	۰/۲۳۱	۱/۲۴۰
a	۱/۹۰۰	۰/۵۱	۲۰	۸۳/۶۳	۰/۱۹۶	۱/۱۹۸
b	۱/۴۵۵	۰/۵۶	۲۰	۸۸/۷۶	۰/۱۲۹	۱/۱۵۶
c	۱/۳۸۶	۰/۵۲	۲۰	۸۸/۰۳	۰/۱۳۳	۱/۱۱۴
d	۱/۲۸۲	۰/۵۴	۲۰	۸۸/۹۲	۰/۱۱۸	۱/۰۷۲

PHB: Polyhydroxybutyrate

بین مقدار مدول در نمونه‌های دارای کیتوسان مشاهده نشد. در عین حال، چقرمگی و بیشینه‌ی کشش داربست‌ها، با افزایش کیتوسان افزایش یافت؛ به طوری که مقدار آن از ۱۶۳۴/۰۱۹ که مربوط به داربست PHB خالص است، به ۲۴۶۸/۴۳۴ که مربوط به داربست حاوی ۲۰ درصد کیتوسان است، افزایش یافت.

بنا بر این، طبق پیش‌بینی صورت گرفته، با افزودن کیتوسان به پلی‌هیدروکسی بوتیرات، میزان استحکام کششی و Young's modulus کاهش می‌یابد و از طرف دیگر، بیشینه‌ی کشش و چقرمگی افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج به دست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و آزمون‌های تخلخل‌سنجی، زاویه‌ی تماس با آب و استحکام مکانیکی، مشخص شد که نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، دارای خواص بهینه می‌باشند. بنا بر این، به عنوان نمونه‌های اصلی برای آزمون سلولی انتخاب شدند.

#### بررسی نتایج طیف‌سنجی با پرتو مادون قرمز به روش تبدیل فوریه (FTIR)

روش FTIR ابزاری قوی برای کسب اطلاعاتی نظیر بلورینگی و وجود برهم‌کنش‌های خاص در مورد سیستم‌های آلیاژی است. شکل ۸، طیف FT-IR پلیمرهای PHB، کیتوسان و آلیاژ آن‌ها را نشان می‌دهد.

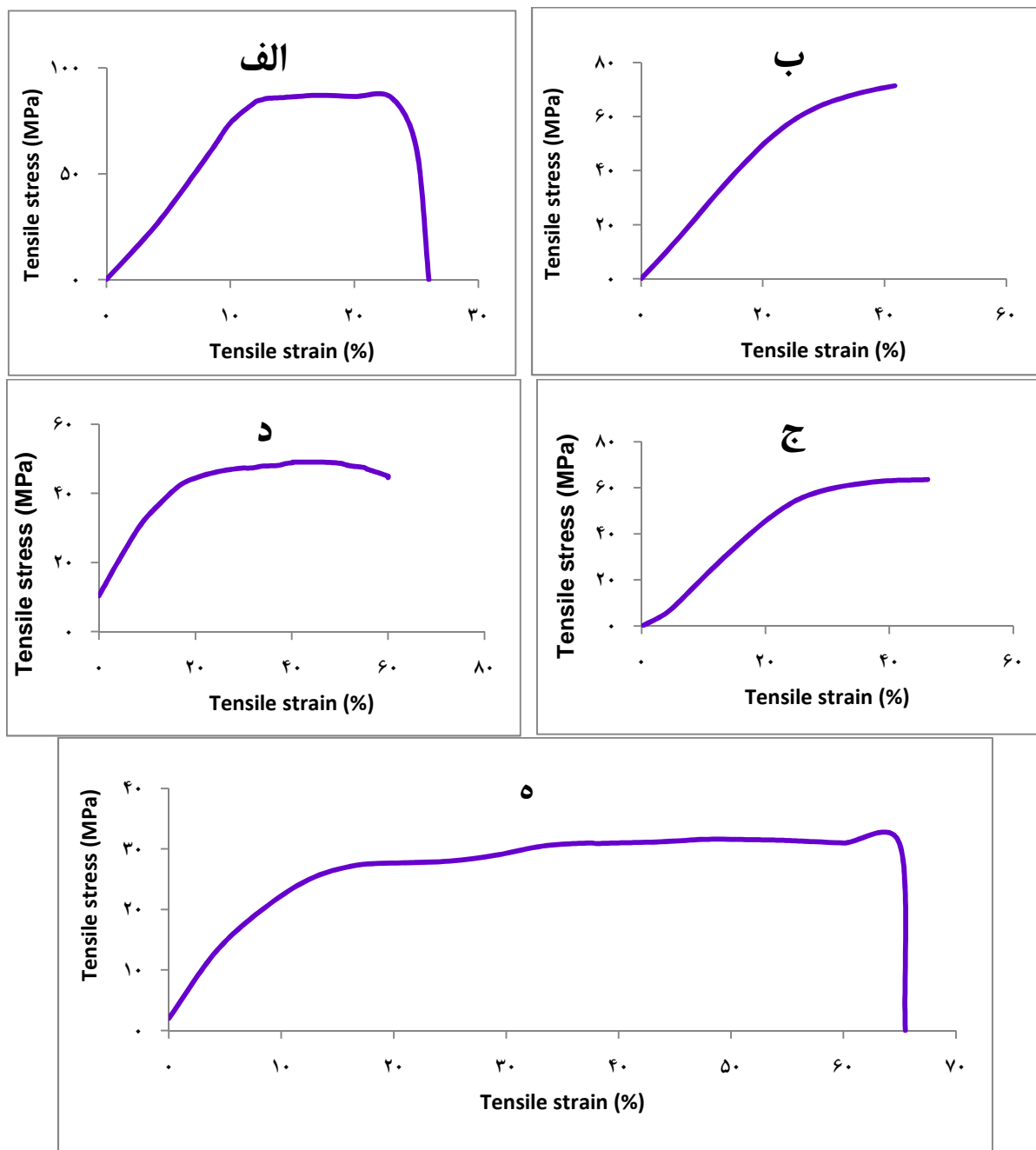
#### نتایج آزمون استحکام کششی داربست‌ها

پلی‌هیدروکسی بوتیرات، پلیمری ترد است که میزان تردی آن وابسته به درجه‌ی بلورینگی آن است. در مقایسه، کیتوسان پلیمری انعطاف‌پذیر است که با افزودن آن به پلی‌هیدروکسی بوتیرات، می‌توان از طریق تنظیم درجه‌ی بلورینگی پلی‌هیدروکسی بوتیرات، میزان تردی و خواص کششی آن را تغییر داد. نمودارهای تنش - کرنش مربوط به نمونه‌های a تا d در شکل ۷ آمده است. با توجه به شکل ۷ و جدول ۶، یک ارتباط خطی میان مقدار کیتوسان در نمونه‌ها با میزان استحکام کششی، Young's modulus، بیشینه‌ی کشش و چقرمگی (مقاومت مواد در برابر شکست در اثر اعمال تنش) داربست‌ها مشاهده می‌شود. استحکام کششی داربست‌های الکترورسی شده، از ۸۷ مگاپاسکال، که مربوط به داربست PHB خالص است، به ۳۱/۶ مگاپاسکال، که مربوط به نمونه‌ی حاوی ۲۰ درصد کیتوسان است، کاهش یافت.

همچنین، Young's modulus نمونه‌ها، با افزودن ۵ درصد کیتوسان، از ۷۴/۴۵ به ۵۱/۳۴ رسید، اما با افزایش بیشتر کیتوسان تا ۲۰ درصد، مقدار مدول افزایش یافت و به ۵۹/۷۴ رسید، اما اختلاف معنی‌داری

طیف PHB، یک پیک مشخصه‌ی برجسته دارد که مرکز آن در حدود  $1731 \text{ cm}^{-1}$  قرار گرفته است و می‌توان آن را به جذب کششی گروه کربونیل ( $\text{C=O}$ ) مربوط دانست. به علاوه، پیک‌های موجود در مربوط به ارتعاش متقارن گروه  $\text{CH}_3$  می‌باشد.

طیف PHB، یک پیک مشخصه‌ی برجسته دارد که مرکز آن در حدود  $1731 \text{ cm}^{-1}$  قرار گرفته است و می‌توان آن را به جذب کششی گروه کربونیل ( $\text{C=O}$ ) مربوط دانست. به علاوه، پیک‌های موجود در مربوط به ارتعاش متقارن گروه  $\text{CH}_3$  می‌باشد.

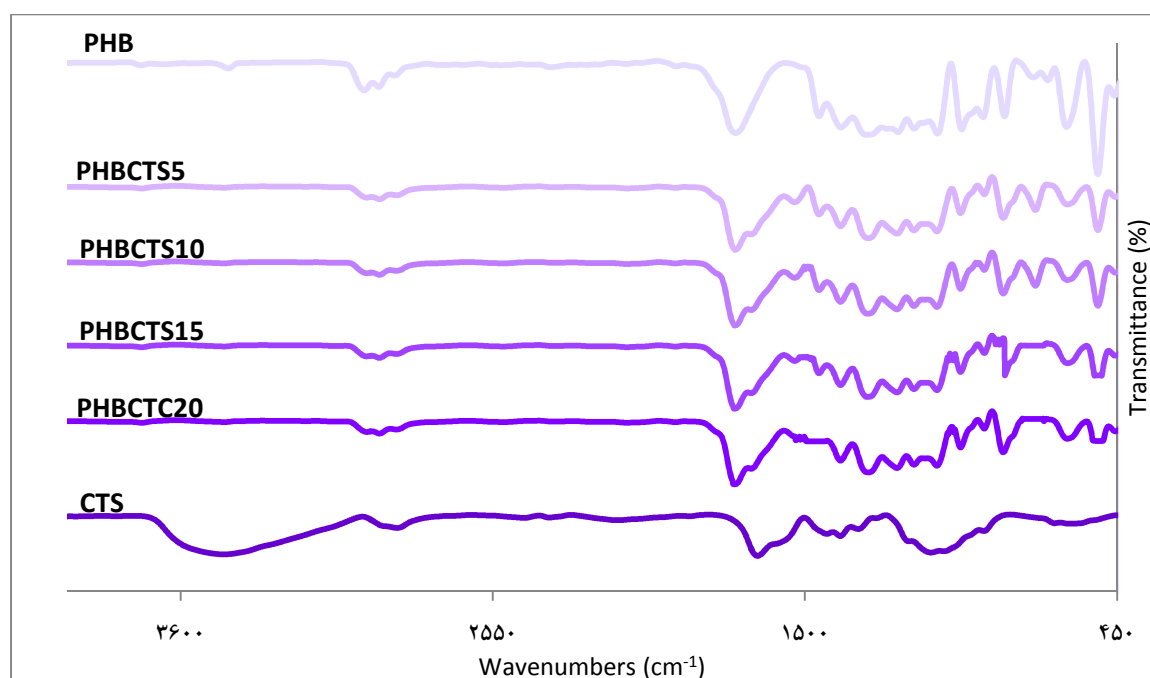


شکل ۷. نمودار تنش- کرنش مربوط به نمونه‌های: الف) PHB (Polyhydroxybutyrate) خالص، ب) PHB/کیتوسان ۵٪، ج) PHB/کیتوسان ۱۰٪، د) PHB/کیتوسان ۱۵٪، ه) PHB/کیتوسان ۲۰٪

جدول ۶. نتایج کمی مربوط به آزمون کشش داربست‌ها

نمونه	بیشینه‌ی کشش (درصد)	چقرمگی	Young's modulus (MPa)	استحکام کششی (MPa)
PHB	۲۶/۰۰	۱۶۳۴/۰۱۹	۷۴/۴۵	۸۷/۰۰
a	۴۱/۶۶	۱۸۷۵/۱۵۲	۵۱/۳۴	۷۱/۳۷
b	۴۶/۰۰	۱۹۸۳/۴۵۲	۵۲/۷۹	۶۳/۶۶
c	۶۰/۰۰	۲۴۶۰/۰۱۲	۵۷/۸۰	۴۹/۰۶
d	۶۵/۵۰	۲۴۶۸/۴۳۴	۵۹/۷۴	۳۱/۶۰

PHB: Polyhydroxybutyrate



شکل ۸. طیف (Fourier transform infrared spectroscopy) FTIR داربست PHB خالص، کیتوسان و داربست‌های آلیاژی (Polyhydroxybutyrate/Chitosan) PHB/CTS حاوی درصدهای مختلف کیتوسان

نیز به عدد موج‌های بالاتر جابه‌جا می‌شوند. حضور این پیک‌ها و ضعیف‌تر شدن آن‌ها در اثر افزایش کیتوسان، نشان دهنده‌ی وجود مرحله‌ی بلوری PHB، اما آمورف‌تر شدن ساختار می‌باشد.

#### بررسی سلول‌ها بر روی داربست‌های فیبری

در این بخش، مورفولوژی سلول‌های کندروسیت و برهم‌کنش سلول‌ها با داربست آلیاژی پلی هیدروکسی-بوتیرات/کیتوسان مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۹ مشخص است، سلول‌های کندروسیت

کیتوسان در حدود  $3455\text{ cm}^{-1}$  و  $1660\text{ cm}^{-1}$  جذب‌های مشخصه‌ای دارد. پیک  $3455\text{ cm}^{-1}$  مربوط به کشش هیدروکسیل ( $\nu_{\text{O-H}}$ ) و کشش N-H است و  $1660\text{ cm}^{-1}$  مربوط به تغییر شکل (Deformation) N-H است که از گروه آمین ناشی می‌شود. با توجه به طیف مربوط به نمونه‌های حاوی کیتوسان، مشخص می‌شود که پیک کربونیل PHB موجود در  $1731\text{ cm}^{-1}$ ، به سمت عدد موج‌های بالاتر جابه‌جا می‌شود. به علاوه، پیک‌های موجود در  $1293\text{ cm}^{-1}$  و  $973\text{ cm}^{-1}$

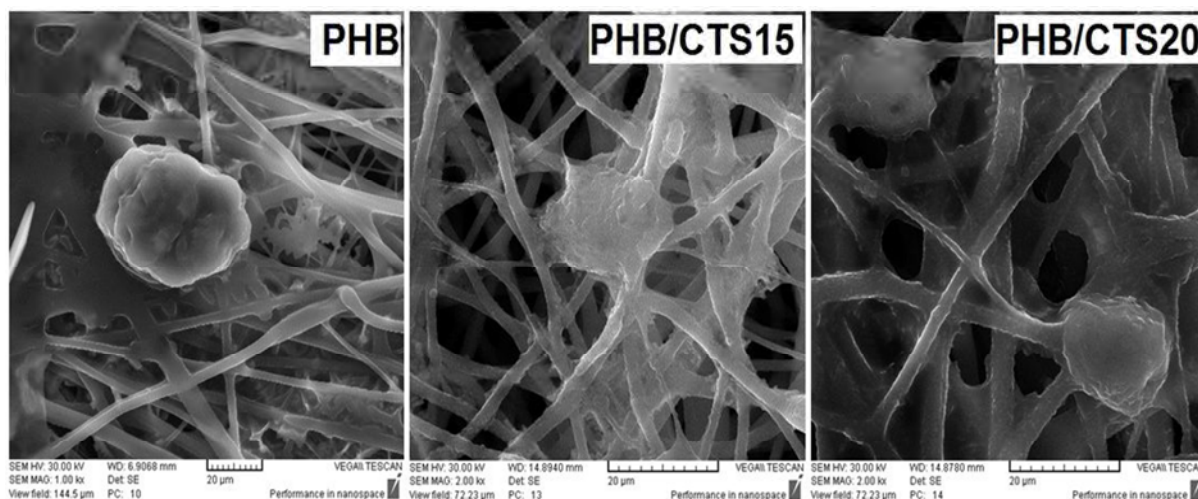
این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه‌ی Correia و همکاران مطابقت دارد. آنان در مطالعه‌ی خود با استفاده از حلال ترکیبی دی‌متیل فرمامید/کلروفرم (با نسبت ۷/۳) محلول‌های ۷ و ۱۰ درصد وزنی PHB را تهیه و الکتروریسی کردند. نتایج، نشان داد که غالب الیاف به دست آمده از محلول ۷ درصد وزنی در محدوده‌ی ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر هستند. در حالی که غالب الیاف به دست آمده از محلول ۱۰ درصد وزنی، قطری بیشتر از ۱ میکرومتر داشتند (۱۴).

همچنین در مطالعه‌ی Wang و Tong، نیز نتایج مشابهی بدست آمد. آنان داربست‌های الکتروریسی شده‌ی کوپلیمر پلی (هیدروکسی بوتیرات-کو-هیدروکسی والرات) را تهیه کردند و تأثیر پارامترهای مختلف را بر قطر الیاف مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که افزایش غلظت و افزایش ولتاژ، هر کدام به طور جداگانه باعث افزایش قطر الیاف می‌شوند. همچنین، نشان دادند که با افزایش فاصله، قطر الیاف حاصل کاهش می‌یابد (۱۵).

با الیاف تمامی نمونه‌ها اتصال خوبی برقرار کردند، اما دو نکته‌ی اساسی در این تصاویر وجود داشت. در داربست فاقد کیتوسان، سلول کندروسیت به داربست چسبیده است، اما پهن نشده و به داخل ماتریس پلیمری داربست نیز نفوذ پیدا نکرده است. اما در داربست‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، سلول‌ها علاوه بر اتصال به الیاف، بر روی آن‌ها پهن شده و به داخل ماتریس پلیمری نیز نفوذ پیدا کرده‌اند.

### بحث

نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد با افزایش غلظت محلول پلیمری، الیاف ضخیم‌تری تشکیل می‌شود و در هر غلظت خاص، با افزایش ولتاژ، میزان یکنواختی الیاف کمتر می‌شود و الیاف با قطر بیشتر به دست می‌آید و همچنین، با افزایش فاصله‌ی سر سوزن سرنگ با صفحه‌ی جمع‌کننده، قطر الیاف و یکنواختی آن‌ها کاهش می‌یابد.



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی سلول‌های کندروسیت تثبیت شده بر روی داربست‌های بهینه‌ی PHB (Polyhydroxybutyrate) خالص، Chitosan/PHB ۱۵٪، Chitosan/PHB ۲۰٪ پس از گذشت ۴ ساعت

همچنین، به نظر می‌رسد که نمونه‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد کیتوسان، دارای الیاف یکنواخت‌تری نسبت به نمونه‌های حاوی ۵ و ۱۰ درصد کیتوسان هستند. این پدیده را می‌توان این طور توجیه کرد که به طور کلی، محلول کیتوسان خالص به دلیل داشتن ویسکوزیته‌ی پایین، قابلیت الکتروریسی مطلوبی ندارد. بنا بر این، وقتی به محلول PHB اضافه می‌شود نیز ویسکوزیته را کاهش می‌دهد و باعث خوب ریسیده نشدن محلول آلیاژی و به دست آمدن الیاف نامناسب می‌شود. از طرف دیگر، کیتوسان به طور طبیعی دارای بار مثبت است.

بنا بر این، زمانی که کیتوسان به PHB اضافه می‌شود، به دلیل داشتن بار مثبت، تمایل محلول پلیمری را برای پرتاب شدن از سر سوزن سرنگ که به قطب مثبت متصل است، به سمت صفحه‌ی جمع کننده که به قطب منفی متصل است، افزایش می‌دهد و از این طریق، باعث بهبود فرایند الکتروریسی می‌شود. از طرفی، چون در ساخت محلول‌ها از حلال TFA استفاده شده است، گروه‌های آمین کیتوسان می‌توانند با TFA ترکیب شوند و نمک تشکیل دهند که این پدیده، به طور مؤثری باعث کمتر شدن برهم‌کنش‌های بین مولکولی در بین مولکول‌های کیتوسان می‌شود و الکتروریسی را تسهیل می‌کند (۱۶).

بنابراین، با افزایش مقدار کیتوسان در محلول آلیاژی، اثر نامطلوب کاهش ویسکوزیته در اثر افزودن کیتوسان جبران می‌شود و الیافی مناسب شکل می‌گیرند. همچنین، طبق پیش‌بینی صورت گرفته، با افزودن کیتوسان به PHB، آب‌دوستی آن افزایش یافت که نشان دهنده‌ی مؤثر بودن راهکار اعمال شده است. نتایج حاصل از آزمون استحکام کششی

داربست‌های آلیاژی، با نتایج حاصل از مطالعه‌ی Daranarong و همکاران که در آن داربست‌های آلیاژی پلی هیدروکسی بوتیرات/پلی (لاکتید-کو-کاپرولاکتون) تهیه شدند، مطابقت دارد. مطالعه‌ی آنان نشان داد که با افزایش میزان پلی (لاکتید-کو-کاپرولاکتون) در آلیاژ، استحکام کششی داربست‌ها کاهش و بیشینه‌ی کشش آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۷).

همچنین، طیف‌های به دست آمده از آنالیز FTIR نشان دهنده‌ی کاهش مرحله‌ی بلوری PHB و افزایش مرحله‌ی آمورف آن در اثر افزودن کیتوسان می‌باشد. این پدیده، از تشکیل باندهای هیدروژنی درون مولکولی بین گروه‌های جانبی آمین در کیتوسان با گروه‌های کربونیل در PHB ناشی می‌شود که در نهایت، باعث کاهش بلورینگی در فیبرهای آلیاژی می‌شود. این نوع برهم‌کنش، به عنوان پل ارتباطی بین پلیمرها عمل می‌کند و امتزاج پذیری دو پلیمر را در آلیاژ تسهیل می‌کند.

Ikejima و همکاران نیز در مورد آلیاژهای PHB/کیتوسان به نتایج مشابهی دست یافتند. با این تفاوت که در آلیاژهایی که آن‌ها تهیه کردند، کیتوسان غالب بود. در مطالعه‌ی آنان نیز طیف‌های FTIR به دست آمده از آلیاژها، نشان داد که با افزایش کیتوسان (بیش از ۷۰ درصد)، پیک بلوری به طور کامل حذف و پیک آمورف ظاهر می‌شود. اما برای درصدهای کیتوسان زیر ۷۰ درصد، پیک گروه کربونیل مشاهده می‌شود و با افزایش مقدار کیتوسان در آلیاژ، پیک آمورف قوی‌تر می‌شود (۱۸).

نفوذ سلول‌های کندروسیت به بستر پلیمری الیاف در داربست‌های حاوی کیتوسان، نشان دهنده‌ی مناسب‌تر بودن آن‌ها برای سلول‌ها در مقایسه با

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد داود صادقی به شماره ۳۹۳۳۴۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه سپاسگزاری می‌نماییم. همچنین، از رئیس بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، جناب آقای دکتر محمد علی شکرگزار که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌شود.

داربست‌های فاقد کیتوسان است. همچنین، به نظر می‌رسد که تعداد سلول‌های چسبیده به داربست‌های حاوی کیتوسان در مقایسه با داربست فاقد کیتوسان، بیشتر است که نشان دهنده‌ی تمایل بیشتر سلول‌ها برای چسبیدن به داربست حاوی کیتوسان در مقایسه با داربست PHB خالص می‌باشد. بنا بر این، با افزودن کیتوسان به PHB، آب‌دوستی، خواص مکانیکی و رفتار بیولوژیکی آن بهبود می‌یابد.

## References

- Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater* 2013; 25: 248-67.
- Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(5): 235-8.
- Portocarrero G, Collins G, Livingston Arinze H. Challenges in cartilage tissue engineering. *J Tissue Sci Eng* 2013; 4(1): e120.
- Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. New York, NY: Academic Press; 2011.
- O'Brien FJ. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011; 14(3): 88-95.
- Gardin C, Ferroni L, Favero L, Stellini E, Stomaci D, Sivoletta S, et al. Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *Int J Mol Sci* 2012; 13(1): 737-57.
- Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005; 26(33): 6565-78.
- Williams SF, Martin DP, Horowitz DM, Peoples OP. PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 1999; 25(1-3): 111-21.
- Misra SK, Valappil SP, Roy I, Boccaccini AR. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2006; 7(8): 2249-58.
- Doyle C, Tanner ET, Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* 1991; 12(9): 841-7.
- Luklinska ZB, Schluckwerder H. In vivo response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite. *J Microsc* 2003; 211(Pt 2): 121-9.
- Godoi FC, Pereira NR, Rocha SCS. Analysis of the drying process of a biopolymer (polyhydroxybutyrate) in rotating-pulsed fluidized bed. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2015; 50(7): 623-9.
- Badwan A, Al-Remawi M. Chitosan-silicon dioxide coprecipitate and use as excipient in solid dosage forms [Google Patents: CA 2616470 A1]. 2006.
- Correia DM, Ribeiro C, Ferreira JCC, Botelho G, Ribelles JLG, Lanceros-Mendez S, et al. Influence of electrospinning parameters on poly(hydroxybutyrate) electrospun membranes fiber size and distribution. *Polym Eng Sci* 2014; 54(7): 1608-17.
- Tong HW, Wang M. Electrospinning of Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Effects of Electrospinning Parameters and Solution Properties. *J Macromol Sci, Part B* 2011; 50(8): 1535-58.
- Sun K, Li ZH. Preparations, properties and applications of chitosan based nanofibers fabricated by electrospinning. *Express Polymer Letters* 2011; 5(4): 342-61.
- Daranarong D, Chan RTH, Wanandy NS, Molloy R, Punyodom W, Foster JR. Electrospun polyhydroxybutyrate and poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) Composites as Nanofibrous Scaffolds. *BioMed Research International* 2014; 2014(1): 12.
- Ikejima T, Yagi K, Inoue Y. Thermal properties and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) in blends with chitin and chitosan. *Macromol Chem Phys* 1999; 200(2): 413-21.



## Evaluation of the Structural Properties and Cellular Behavior of Electrospun Poly(hydroxybutyrate)/Chitosan Blend Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering

Davoud Sadeghi MSc<sup>1</sup>, Saeed Karbasi PhD<sup>2</sup>, Shahin Bonakdar PhD<sup>3</sup>, Shahnaz Razavi PhD<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Achieving to a scaffold with suitable properties is a current challenge in tissue engineering. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a polymer which has attracted attentions due to have favorable properties such as good biocompatibility and relative high mechanical properties; but, its hydrophobicity and brittleness are not suitable for cartilage tissue engineering scaffold fabrication. Blending with other polymers is a strategy to solve this problem. This study aimed to prepare electrospun PHB/chitosan (CTS) blend scaffold and to investigate its structural properties and cellular behavior.

**Methods:** First, polymeric solutions of PHB in trifluoroacetic acid (TFA) were electrospun and after optimization of parameters, various percentages of chitosan with aim to improve its hydrophilicity and mechanical properties were added to polymeric solution and electrospun. To characterize prepared scaffolds, scanning electron microscopy (SEM), tensile strength test, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), contact angle measurement, and porosimetry were performed. According to the obtained results, the scaffold containing 15 and 20 percent of chitosan were selected as the optimized scaffolds and were examined for rabbit chondrocyte cell adhesion test.

**Findings:** Scanning electron microscopy images showed that electrospinning of the solution with PHB of 9 percent by weight (wt%) in 21 kilovolt at 15 cm produced the most uniform fibers; the scaffolds containing 10, 15 and 20 percent of CTS have more uniform fibers than the scaffold containing 5 percent. Finally, based on the results of other experiments, the scaffolds containing 15 and 20 percent of chitosan were identified as optimized scaffolds. SEM images showed good chondrocyte cell adhesion on these scaffolds.

**Conclusion:** Addition of chitosan to PHB, can improve its mechanical and biological properties and hydrophilicity.

**Keywords:** Cartilage tissue engineering, Polyhydroxybutyrate, Chitosan, Electrospinning

**Citation:** Sadeghi D, Karbasi S, Bonakdar Sh, Razavi Sh. **Evaluation of the Structural Properties and Cellular Behavior of Electrospun Poly(hydroxybutyrate)/Chitosan Blend Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1441-58

1- Department of Biomaterials and Tissue Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biomaterials and Tissue Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Davoud Sadeghi MSc, Email: davoud.sadeghi@yahoo.com

## بررسی تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج دنداندار از تشکیلات هایپوکامپ

دکتر غلامرضا دشتی<sup>۱</sup>، دکتر بهمن رشیدی<sup>۱</sup>، دکتر پرهام رئیسی<sup>۲</sup>، لیلا رهافروز<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** برخی مطالعات بیانگر تأثیر افزایش غیر طبیعی آهن و کلسترول در مغز در پاتوزن بیماری‌های نورودژنراتیو همچون آلزایمر می‌باشد، اما مطالعات انجام گرفته در این زمینه اندک و نتایج آن‌ها با یکدیگر متناقض است. از آن جایی که شیوع این بیماری‌ها، به ویژه آلزایمر در حال افزایش می‌باشد، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج دنداندار از تشکیلات هایپوکامپ به انجام رسید.

**روش‌ها:** رت‌های نر نیوزلندی به گروه‌های شاهد، آهن (رژیم ۵۰ mg/kg)، گروه کلسترول (رژیم حاوی کلسترول ۲ درصد) و گروه کلسترول و آهن تقسیم شدند. سطح سرمی کلسترول، LDL (Low-density lipoprotein) و HDL (High-density lipoprotein) قبل و بعد از رژیم ۶ هفته‌ای بررسی و اندازه‌گیری شد و سپس میزان آپوپتوز سلول‌های عصبی در تشکیلات هایپوکامپ آن‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی TUNEL test (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** پس از استفاده از رژیم غذایی پر کلسترول، سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL در گروه‌های دریافت کننده کلسترول به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). همچنین، آپوپتوز سلول‌های عصبی در شکاف دنداندار هایپوکامپ در گروه دریافت کننده رژیم پر کلسترول در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). استفاده از آهن به تنهایی یا همراه با کلسترول، تأثیری بر میزان آپوپتوز سلول‌های عصبی نداشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که تجویز رژیم غذایی پر کلسترول بر سطح آپوپتوز سلولی تأثیر معنی‌دار دارد؛ به طوری که تجویز رژیم حاوی کلسترول تنها و رژیم آهن و کلسترول، سطح آپوپتوز سلولی را افزایش می‌دهد. اما تجویز آهن، تأثیر قابل ملاحظه و معنی‌داری در افزایش یا کاهش آپوپتوز ندارد.

**واژگان کلیدی:** آلزایمر، آپوپتوز، رژیم پر کلسترول، آهن

**ارجاع:** دشتی غلامرضا، رشیدی بهمن، رئیسی پرهام، رهافروز لیلا. بررسی تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج

دنداندار از تشکیلات هایپوکامپ. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۹): ۱۴۶۷-۱۴۵۹

پیدایش شماری از بیماری‌های نورودژنراتیو از قبیل پارکینسون و آلزایمر خواهد شد (۱-۲). مطالعات نشان دهنده‌ی افزایش غلظت آهن در تشکیلات هایپوکامپ، آمیگدال و کورتکس پری‌فورم در بیماران

### مقدمه

آهن، یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در بدن انسان، به خصوص در بافت مغز و کبد می‌باشد. ثابت شده است که افزایش غیر طبیعی آهن در مغز، سبب

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

سلول‌ها می‌شود و متابولیت‌های کلسترول نیز در ایجاد اثرات سیتوتوکسیک و تولید اکسیژن واکنش پذیر نقش مهمی دارند (۵). این اثرات، در مجموع سبب فعال‌سازی واسطه‌های التهابی و کاهش انعطاف‌پذیری غشای سلول‌های عصبی، پلاستیسیته سیناپسی و در نهایت مرگ سلول‌های عصبی خواهند شد (۱۱). شیوع بالاتر بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر در کشورهای غربی، می‌تواند در ارتباط با رژیم غذایی پر کلسترول و چرب در این کشورها باشد (۵).

با توجه به اثرات اکسیدان و آپوپتوتیک کلسترول، هدف از این مطالعه، بررسی اثرات آهن و کلسترول بر آپوپتوز سلول‌های عصبی در شکنج دندانه‌دار هیپوکامپ رت‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پر کلسترول و آهن بود.

### روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه رت‌های نر از نژاد سفید نیوزلندی با وزن  $200 \pm 2200$  گرم بود.

روش کار بدین صورت بود که در ابتدا آزمودنی‌ها در شرایط سیکل تاریکی و روشنی به صورت ۱۲ ساعته و غذا و آب بدون هیچ محدودیتی نگهداری شدند. سپس رت‌ها به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند:

۱. گروه اول غذای معمول (شاهد)
۲. گروه دوم غذای پر کلسترول (حاوی کلسترول ۲ درصد)
۳. گروه سوم غذای معمول و آهن ( $50 \text{ mg/kg}$ )
۴. گروه چهارم غذای پر کلسترول و آهن (حاوی کلسترول ۲ درصد و  $50 \text{ mg/kg}$  آهن)

مبتلا به آلزایمر می‌باشند (۳). پراکسید هیدروژن، یکی از رادیکال‌های آزاد است و می‌تواند به وسیله‌ی گلوکاتینون دفع شود. در حضور آهن آزاد در پلاسما، پراکسید هیدروژن به یون هیدروکسیل اکسیده می‌شود که از رادیکال‌های آزاد با قدرت بالا و خطرناک می‌باشد. این رادیکال‌های آزاد، پروتئین و چربی موجود در غشای سلولی را اکسید می‌کند که منجر به عدم یکپارچگی سلول و در نهایت مرگ آن خواهد شد (۳-۴).

کلسترول نیز نقش مهمی در پاتوژنر بیماری آلزایمر ایفا می‌کند (۷-۵). کلسترول، یک لیپید سلولی است که جهت فعالیت سلولی عصبی و نیز سلول‌های گلیا در مغز ضروری است. این ترکیب، در تنظیم فعالیت آنزیم‌های متصل به غشا، گیرنده‌ها، کانال‌های یونی، اندوسیتوز، بیان آنتی‌ژن‌ها و پایداری میکروتوبول‌ها در سلول‌های عصبی نقش دارد (۹-۸). از طرفی، اختلال در هموستاز کلسترول، سبب ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر و نیمان پیک تیپ C خواهد شد (۱۰).

بارزترین علامت بیماری آلزایمر، تجمع غیر طبیعی پروتئین  $\beta$ -آمیلوئید در نواحی خاصی از مغز می‌باشد. تولید و نیز کلیرانس این پروتئین توسط سطح سلولی کلسترول تنظیم می‌شود (۱۱). سطح افزایش یافته‌ی کلسترول، سبب افزایش این پروتئین در سلول‌های مغز مدل‌های حیوانی مبتلا به آلزایمر خواهد شد (۱۲). مهم‌ترین عوامل خطر ژنتیکی که در ایجاد بیماری آلزایمر نقش دارد، جهش روی ژن مربوط به آپولیپوپروتئین E (APOE) یا Apolipoprotein E است که نقش کلیدی در تنظیم کلسترول دارد (۷).

سطح افزایش یافته‌ی کلسترول در سلول‌های عصبی، سبب القای استرس اکسیدان در این

اسلایدها برای مدتی حدود ۱۲۰-۳۰ دقیقه در اون (Oven) با دمای  $58^{\circ}\text{C}$ - $56^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت تا پارافین مقطع بافتی ذوب شود و علاوه بر آن، بافت به خوبی بر روی لام بچسبد و در حین رنگ آمیزی جدا نشود. سپس برای تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک، از روش TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) با استفاده از کیت‌های تشخیصی شرکت Roch و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده استفاده گردید. بعد از فاصله‌ی کوتاهی از برداشتن پارافین (Dewaxation) کردن)، اسلایدها با پروتئیناز k تیمار شد و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس اسلایدها با محلول PBS (Phosphate-buffered saline) در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  شستشو داده شد و در محلول حاوی  $0.1\text{ M}$  Tris-HCL در pH ۷ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس دوباره با محلول PBS شستشو داده شد. سپس ترکیب واکنشی TUNEL اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در محفظه‌ی مرطوب انکوبه گردید.

در مرحله‌ی بعد، اسلایدها شسته و دی آمینو-بنزیدین (DAB یا ۳,۳-Diaminobenzidine) برای مدت ۱۵-۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. بعد از آن، با آب شیر شستشو داده شد و با همتوکسیلین رنگ زمینه‌ای انجام شد. سپس نمونه‌ها در گزلیل شفاف‌سازی گردید و با ریختن یک یا دو قطره چسب کانادا بالزام یا انتلان روی برش، با دقت لامل روی برش گذاشته و با فشار مختصر چسب پخش شد تا به طور یکنواخت و بدون حباب، هوا زیر لامل قرار گیرد. لام‌ها تمیز شد و پس از خشک شدن چسب، نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری

هر گروه به مدت ۶ هفته رژیم غذایی را دریافت کردند و در مرحله‌ی بعد، پس از بیهوش کردن و جدا کردن سر حیوان، مغز از مجموعه خارج و پس از تثبیت در فرم‌آلدهید ۴ درصد بافر شد و پس از پاساژ بافتی، در پارافین قالب‌گیری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ نوری: برای این که روند تثبیت به خوبی انجام گیرد، ابعاد نمونه‌ها تا حد امکان کوچک انتخاب گردید و حجم تثبیت کننده حدود ۱۰۰-۵۰ برابر حجم نمونه بود و نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در تثبیت کننده باقی ماندند. مواد تشکیل دهنده‌ی تثبیت کننده شامل  $100\text{ cc}$  فرمالین ۱۰ درصد،  $900\text{ cc}$  آب مقطر،  $4\text{ g}$  سدیم فسفات مونوبازیک،  $6/5\text{ g}$  سدیم فسفات دی‌بازیک بودند.

سپس مراحل پاساژ یا گردش بافت بر اساس روش‌های متداول شامل آب‌گیری (Dehydration)، شفاف‌سازی C (Leering)، آغشتگی (Impregnation) و قالب‌گیری (Embedding) انجام گرفت.

برای تهیه مقاطع میکروسکوپی، نمونه‌ها در بلوک‌های پارافینی قالب‌گیری شدند. برای این منظور از قطعات Luckhart استفاده شد. برای قالب‌گیری ابتدا لازم است که پارافین ذوب شود و پارافین مذاب به درون قالب تهیه شده ریخته شود و سپس نمونه‌ی بافت به وسیله‌ی یک پنس گرم برداشته و در جهت (Orientation) مناسب در پارافین قرار داده شود. بدین ترتیب، نمونه در داخل بلوک پارافینی آماده‌ی برش می‌گردد.

برش یا مقطع‌گیری (Sectioning): با میکروتوم دوار (Rotary) مقاطعی به ضخامت  $3-5\ \mu$  تهیه گردید. روی لام، چند قطره الکل ۱۰ درصد ریخته شد و یک سری ۴-۶ تایی از مقاطع تهیه شده روی آن باز گردید.

و نیز کلسترول و آهن، سطح کلسترول به طور معنی‌داری بالا رفت (به ترتیب  $P = 0/001$  و  $P < 0/001$ ) (شکل ۱).

میانگین سطح سرمی LDL قبل از مداخله، در چهار گروه تحت مطالعه طبق آزمون One-way ANOVA، اختلاف معنی‌داری نداشت ( $P = 0/770$ )؛ اما بعد از مداخله، در گروه‌های دریافت کننده کلسترول، تفاوت معنی‌دار وجود داشت ( $P < 0/001$ ) (شکل ۲).

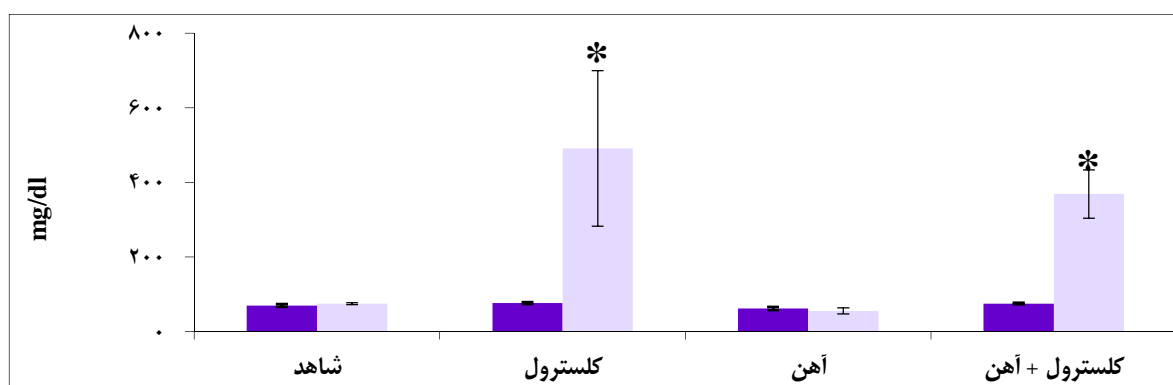
طبق آزمون One-way ANOVA، میانگین سطح سرمی HDL قبل از مداخله، اختلاف معنی‌داری در چهار گروه نداشت؛ اما بعد از مداخله، در گروه‌های دریافت کننده کلسترول، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۳). از طرف دیگر، آزمون Repeated measures ANOVA نیز نشان داد که تغییرات سطح کلسترول، LDL و HDL در چهار گروه مذکور اختلاف معنی‌دار دارد.

انجام آزمون تعقیبی LSD بر روی داده‌ها نشان داد که درصد آپوپتوز سلولی بین دو گروه شاهد و دریافت کننده آهن، اختلاف معنی‌دار نداشت، اما درصد آپوپتوز سلولی در گروه دریافت کننده کلسترول نسبت به گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۴).

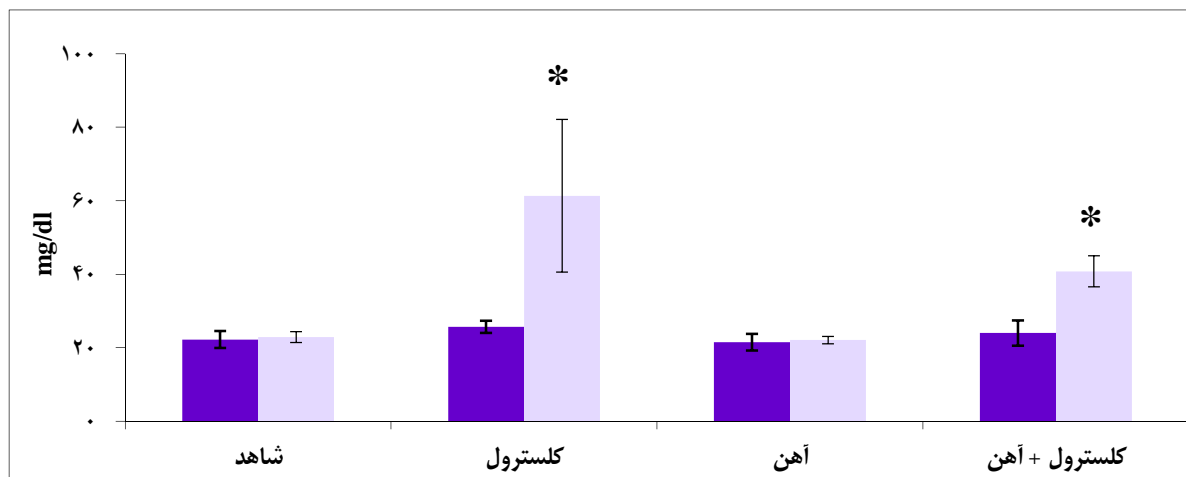
آماده شد. سپس با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد و با استفاده از نرم‌افزار تصویری Motic شمارش سلول‌های آپوپتوتیک انجام شد. نتایج بافتی با استفاده از آزمون‌های Non parametric one-way ANOVA، Dunn's multiple comparisons test for post test و Kruskal-Wallis و نتایج سطح سرمی کلسترول تام، (Low-density lipoprotein) LDL و (High-density lipoprotein) HDL با آزمون‌های Repeated measures ANOVA و Tukey آنالیز شد.

### یافته‌ها

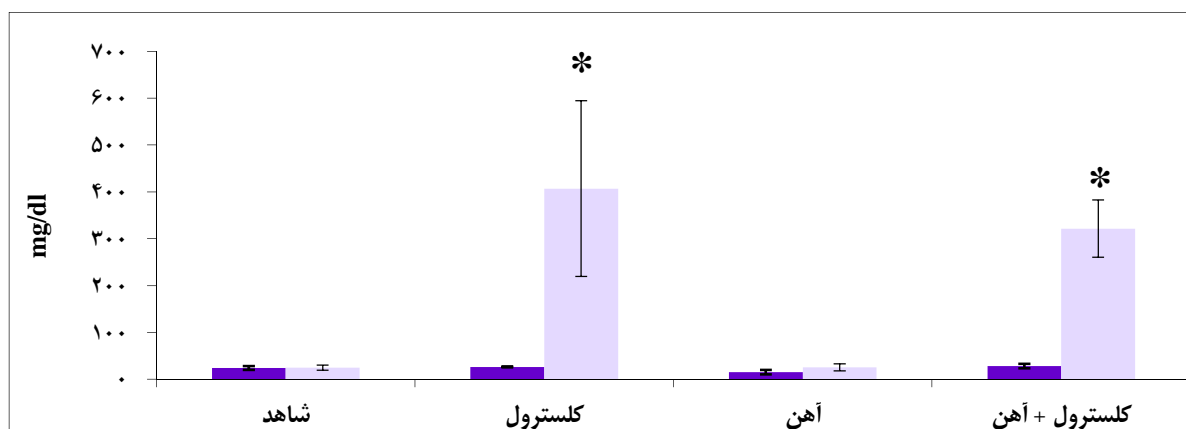
در این مطالعه، ۲۰ سر رت نر در چهار گروه ۵ تایی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. میانگین سطح کلسترول قبل از مداخله در چهار گروه شاهد، آهن، پر کلسترول و نیز پر کلسترول و آهن، طبق آزمون One-way ANOVA، اختلاف معنی‌داری نداشت، اما بعد از مداخله، در سطح سرمی کلسترول در گروه‌های دریافت کننده کلسترول، تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. از طرف دیگر، سطح کلسترول در گروه شاهد و گروه آهن نسبت به قبل از مداخله، تفاوت محسوسی پیدا نکرد؛ اما در دو گروه رژیم پر کلسترول



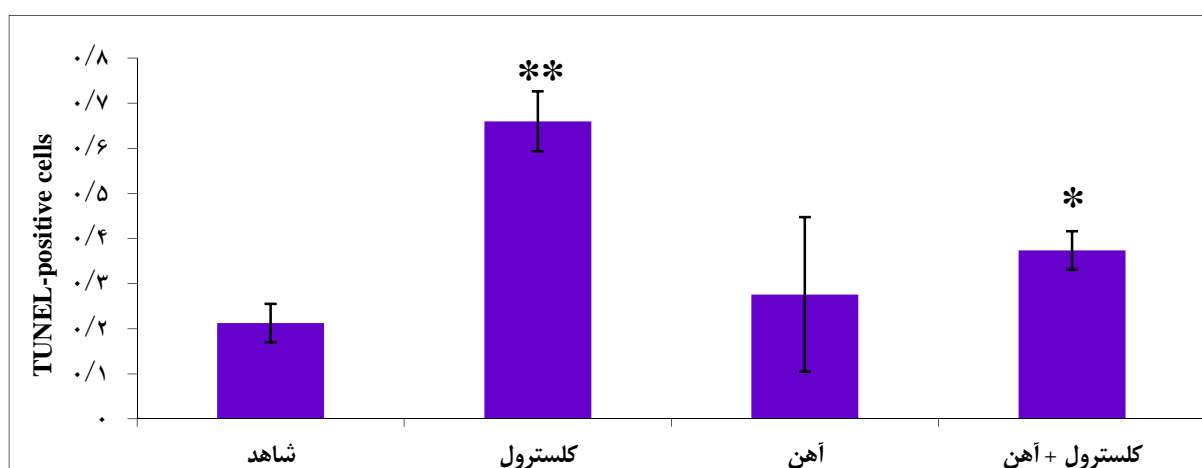
شکل ۱. سطح سرمی کلسترول در گروه‌های مورد مطالعه قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول ( $n = 5$ ; \* $P < 0/050$  در مقایسه با گروه شاهد)



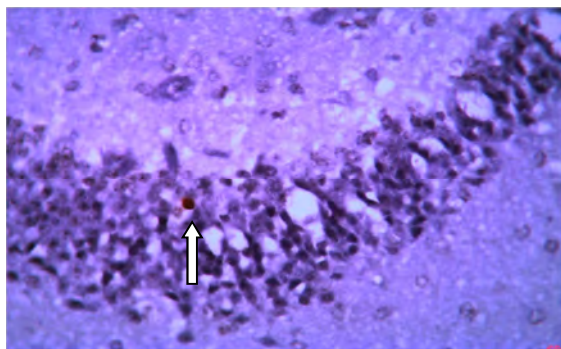
شکل ۲. سطح سرمی HDL (High density lipoprptein) در گروه‌های مورد مطالعه قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول (n = ۵): \* P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه شاهد)



شکل ۳. سطح سرمی LDL (Low density lipoprptein) در گروه‌های مورد مطالعه قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول (n = ۵): \* P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه شاهد)



شکل ۴. میزان آپتوز در سلول‌های لایه‌ی گرانولوزای هایپوکامپ رت‌ها قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول (n = ۵): \* P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه شاهد)



شکل ۷. فتومیکروگراف از ناحیه هیسته دندانهای در هایپوکامپ در گروه دریافت کننده کلسترول به همراه آهن با رنگ آمیزی

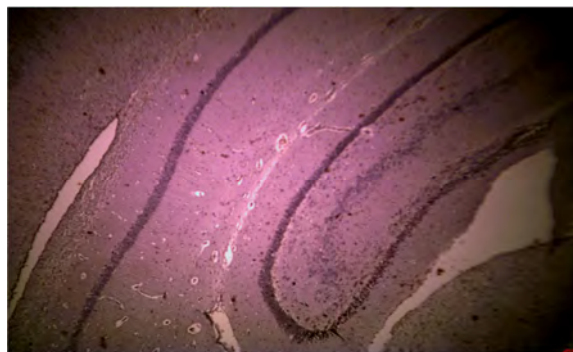
ایمونوهیستوشیمیایی TUNEL

(Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-)  
(dUTP nick end labeling)

سلولهای آپپتوتیک به صورت قهوه‌ای رنگ مشخص است.

بزرگ‌نمایی  $\times 40$

نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که کلسترول سبب افزایش قابل ملاحظه در میزان مرگ سلول‌های عصبی در تشکیلات دنداندار هایپوکامپ گردید ( $P < 0.05$ ) (اشکال ۵ و ۶).



شکل ۵. فتومیکروگراف از ناحیه هیسته دندانهای در هایپوکامپ

با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی TUNEL

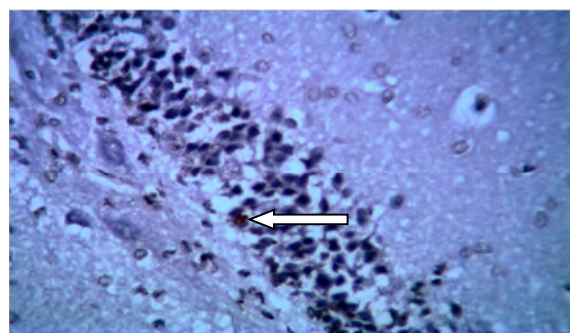
(Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-)

(dUTP nick end labeling). بزرگ‌نمایی  $\times 4$

### بحث

هدف کلی از انجام این مطالعه، تعیین تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپتوز در شکنج دنداندار از تشکیلات هایپوکامپ بود. مقایسه‌ی سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL در بین گروه‌ها نشان دهنده‌ی آن است که این عامل در تمامی گروه‌ها قبل از شروع رژیم‌ها یکسان بوده است. پس از دریافت رژیم پر کلسترول به مدت ۶ هفته، سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL در گروه پر کلسترول و نیز گروه پر کلسترول و آهن افزایش قابل توجهی نسبت به قبل از شروع رژیم در همان گروه‌ها و نیز نسبت به گروه شاهد داشت. علاوه بر این، مصرف آهن در گروه پر کلسترول و آهن نیز سبب کاهش قابل ملاحظه‌ی سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL نشد.

در این بررسی، کلسترول سبب افزایش معنی‌دار در میزان مرگ سلول‌های عصبی در تشکیلات دنداندار هایپوکامپ گردید؛ ولی استفاده از آهن سبب کاهش



شکل ۶. فتومیکروگراف از ناحیه هیسته دندانهای در هایپوکامپ

گروه دریافت کننده کلسترول با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl)

(transferase biotin-dUTP nick end labeling)

سلولهای آپپتوتیک به صورت قهوه‌ای رنگ مشخص است.

بزرگ‌نمایی  $\times 40$

استفاده از آهن سبب کاهش معنی‌دار در میزان مرگ سلول‌های عصبی در تشکیلات هایپوکامپ نشد؛ میزان آپتوز سلولی، بین گروه‌های پرکلسترول و پرکلسترول و آهن تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۷).

عهده دارد. این ماده در تشکیل میوگلوبین نیز نقش دارد که ماده‌ی رنگی موجود سلول‌های عضلانی است و اکسیژن را برای استفاده در مواقع فعالیت ذخیره می‌کند. بیشترین میزان تجمع آهن در مغز، در سلول‌هایی دیده می‌شود که غلاف میلین را تولید می‌کنند و تخریب غلاف میلین، سبب از بین رفتن سلول‌های مغزی و تشدید آلزایمر می‌گردد (۱۱).

این تأثیر، ناشی از اثرات اکسیداتیو عنصر آهن بر روی سیستم عصبی می‌باشد (۴). در مجموع، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که به دنبال مصرف کلسترول، آپوتوز به شدت افزایش می‌یابد و رژیم پر آهن به تنهایی، نتوانسته تغییری در آپوتوز ایجاد کند؛ نیز زمانی که با کلسترول به کار رفت، تأثیر محسوسی در مرگ سلول‌ها نداشت. با توجه به آن که این مطالعه بر روی حیوانات سالم انجام گرفت، به نظر می‌رسد شرایطی چون مدت و زمان دریافت نیز نقش به‌سزایی دارد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای لیلا ره‌افروز به شماره‌ی ۲۹۰۳۳۶ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که در معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه تصویب و اجرا شده است. بدین وسیله، نویسندگان از حمایت‌های بی‌دریغ این معاونت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

معنی دار در میزان مرگ سلول‌های عصبی در تشکیلات هاپیوکامپ نشد. یافته‌های این مطالعه، تأیید کننده‌ی نتایج مطالعات قبلی بود (۱۱). این نتایج نشان می‌دهند که مصرف بیش از حد کلسترول می‌تواند سبب افزایش آپوتوز و مرگ سلول‌های عصبی در لایه‌ی گرانولوزا از سلول‌های هاپیوکامپ رت‌های نر شود.

هایپرکلسترولمی، عامل خطر مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر شناخته شده است (۷، ۵)؛ به طوری که این ترکیب، در تنظیم فعالیت آنزیم‌های متصل به غشا، گیرنده‌ها، کانال‌های یونی، اندوستیوز، بیان آنتی‌ژن‌ها و پایداری میکروتوبول‌ها در سلول‌های عصبی نقش دارد (۸-۹) و اختلال در هموستاز کلسترول، سبب ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو خواهد شد (۱۰).

از این رو، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که بالا بودن سطح کلسترول (حداقل در مدل حیوانی) باعث افزایش سطح آپوتوز سلولی می‌شود و بدین طریق، با تسریع دژنراسیون سلول‌های مغزی، در بروز بیماری‌هایی مانند آلزایمر نقش قابل توجهی دارد.

آهن، یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در بدن انسان، به خصوص در بافت مغز و کبد می‌باشد که در بدن انسان تولید نمی‌شود؛ بلکه از طریق تغذیه وارد بدن می‌گردد. این عنصر حیاتی، نقش مهمی در تشکیل گویچه‌های قرمزخون دارد و یک جزء حیاتی از هموگلوبین است که وظیفه‌ی حمل اکسیژن را به

### References

1. Bostanci MO, Bas O, Bagirici F. Alpha-tocopherol decreases iron-induced hippocampal and nigral neuron loss. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30(3): 389-94.
2. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 1994; 63(3): 793-807.
3. Samudralwar DL, Diprete CC, Ni BF, Ehmann WD, Markesbery WR. Elemental imbalances in the olfactory pathway in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1995; 130(2): 139-45.
4. Qian Z, Wang Q, Pu Y. Brain iron and neurological disorders. *Chin Med J (Engl)* 1997;



- 110(6): 455-8.
5. Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P, et al. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol* 2006; 2(5): 249-53.
  6. Crisby M, Rahman SM, Sylven C, Winblad B, Schultzberg M. Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice. Implications for Alzheimer's disease and stroke. *Neurosci Lett* 2004; 369(2): 87-92.
  7. Fuentes F, Lopez-Miranda J, Sanchez E, Sanchez F, Paez J, Paz-Rojas E, et al. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Ann Intern Med* 2001; 134(12): 1115-9.
  8. Jansen S, Lopez-Miranda J, Castro P, Lopez-Segura F, Marin C, Ordovas JM, et al. Low-fat and high-monounsaturated fatty acid diets decrease plasma cholesterol ester transfer protein concentrations in young, healthy, normolipemic men. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(1): 36-41.
  9. Corrigan FM, Van Rhijn AG, Macintyre F, Skinner ER, Horrobin DF. Dietary supplementation with zinc sulphate, sodium selenite and fatty acids in early dementia of Alzheimer's type. II: Effects on Lipids. *Journal of Nutritional Medicine* 1991; 2(3): 265-71.
  10. Yanagisawa K. Cholesterol and amyloid beta fibrillogenesis. *Subcell Biochem* 2005; 38: 179-202.
  11. Ghribi O, Golovko MY, Larsen B, Schrag M, Murphy EJ. Deposition of iron and beta-amyloid plaques is associated with cortical cellular damage in rabbits fed with long-term cholesterol-enriched diets. *J Neurochem* 2006; 99(2): 438-49.
  12. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol* 2006; 13(12): 1385-8.

## The Effect of Iron and Cholesterol on Neuronal Apoptosis in Dentate Gyrus of Hippocampus in Rabbits Fed with High-Cholesterol Diet

Gholam Reza Dashti PhD<sup>1</sup>, Bahman Rashidi PhD<sup>1</sup>, Parham Reisi PhD<sup>2</sup>, Leila Rah-Afrouz<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Some of the studies showed that abnormal high level of iron and cholesterol in the brain had neurodegenerative effects such as in Alzheimer's disease. But, the previous studies in this field were not enough and had controversy in results. As the prevalence of Alzheimer's disease is increasing, this study aimed to evaluate the effect of iron and cholesterol on the level of neuronal apoptosis in dentate gyrus of hippocampal formation.

**Methods:** Male New Zealand white rabbits were divided into the control, the iron (50 mg/kg; gavage), the high-cholesterol diet (containing 2% cholesterol), and the high-cholesterol diet plus iron groups. Serum levels of total cholesterol, high-density lipoprotein (LDL), and low-density lipoprotein (HDL), before and after the regimen for 6 weeks, were measured. Then, the rabbits for immunohistochemical staining via TUNEL test (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) and evaluation of neuronal apoptosis in dentate gyrus of hippocampal formation were anesthetized and brains were dissected.

**Findings:** After the regimens, serum levels of total cholesterol, LDL, and HDL in the cholesterol-receiving groups increased significantly compared to the control group ( $P < 0.05$  for all). Histological results demonstrated that neuronal apoptosis in the dentate gyrus of the high-cholesterol diet group increased significantly ( $P < 0.05$ ) comparing to the control group. Iron had not significant effect when used alone or with cholesterol on neuronal apoptosis in the dentate gyrus in rabbits.

**Conclusion:** Our recent results showed that high-level cholesterol diet had significant effect on the neuronal apoptosis in the dentate gyrus in rabbits; but use of iron alone or with high-level cholesterol diet had not significant effect on it.

**Keywords:** Apoptosis, Alzheimer's disease, Cholesterol, Iron

**Citation:** Dashti GhR, Rashidi B, Reisi P, Rah-Afrouz L. **The Effect of Iron and Cholesterol on Neuronal Apoptosis in Dentate Gyrus of Hippocampus in Rabbits Fed with High-Cholesterol Diet.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1459-67

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
2- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
3- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
**Corresponding Author:** Leila Rah-Afrouz, Email: leila\_afrouz@outlook.com

## بررسی تأثیر پیش داروی خوراکی آلپرازولام بر کنترل فشار خون بیماران مبتلا به پرفشاری خون حین عمل جراحی

دکتر پروین ساجدی<sup>۱</sup>، مرتضی رضایی<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** یکی از مشکلات بزرگ در جراحی بزرگسالان، فشار خون می‌باشد. بیماران با پرفشاری خون، در خطر عوارضی همچون ایسکمی میوکارد، آسیب‌های کلیوی، افزایش فشار خون در ریکاوری و آسیب عروق مغزی می‌باشند. باتوجه به نتایج مثبت بنزودیازپین‌ها در کاهش این عارضه، بر آن شدیم تا اثر آلپرازولام بر کنترل فشار خون بیماران مبتلا به پرفشاری خون، حین عمل جراحی تحت بیهوشی عمومی را بررسی کنیم.

**روش‌ها:** این پژوهش کارآزمایی بالینی، در سال ۱۳۹۳ در مرکز آموزشی-درمانی الزهرای (س) اصفهان به انجام رسید. افراد مورد مطالعه، بیماران مبتلا به پرفشاری خون کاندید عمل جراحی الکتیو با دامنه‌ی سنی ۵۴ تا ۷۶ سال بودند. بیماران به طور تصادفی به دو گروه شاهد و مداخله تقسیم شدند. به گروه مداخله، یک قرص آلپرازولام ۰/۵ میلی‌گرمی به صورت خوراکی داده شد و در گروه شاهد، دارویی تجویز نشد. فشار خون سیستولی و دیاستولی، قبل و حین عمل، میزان مصرف مخدر و شدت درد در ریکاوری و مدت زمان اکستوباسیون و خروج از ریکاوری بررسی و مقایسه شد.

**یافته‌ها:** افزایش فشار خون در گروه مداخله، به طور معنی‌داری در ۴۰ دقیقه‌ی اول جراحی کمتر بود ( $P = ۰/۰۰۱$ ). شدت درد ( $P = ۰/۰۱۲$ ) و میزان مصرف مخدر ( $P = ۰/۰۰۱$ )، در گروه مداخله به طور معنی‌داری کمتر بود.

**نتیجه‌گیری:** طبق نتایج این مطالعه، آلپرازولام تأثیر مطلوبی بر کنترل فشار خون حین عمل جراحی و کاهش شدت درد در ریکاوری داشته است و در صورتی که منع مصرفی نداشته باشد، می‌توان آن را به عنوان پروفیلاکسی تجویز نمود.

**واژگان کلیدی:** آلپرازولام، فشار خون بالا، القای بیهوشی، ریکاوری، بیماران مبتلا به پرفشاری خون

**ارجاع:** ساجدی پروین، رضایی مرتضی. بررسی تأثیر پیش داروی خوراکی آلپرازولام بر کنترل فشار خون بیماران مبتلا به پرفشاری

خون حین عمل جراحی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۹): ۱۴۷۴-۱۴۶۸

بزرگی بطن چپ قلب، اختلال عملکرد سیستولیک به دلیل نارسایی احتقانی قلب، آسیب کلیوی و بیماری‌های انسدادی کرونری و عروق مغزی هستند. سطح خطر، به شدت فشار خون بستگی دارد (۲). متوسط فشار خون طی روند بیهوشی، به دلایل مختلفی از جمله اثرات مستقیم بیهوشی، مهار سیستم

### مقدمه

بنا بر آمارهای موجود، ۲۴/۶ درصد جمعیت جهان دچار پرفشاری خون می‌باشند (۱). وجود پرفشاری خون، می‌تواند سبب پاسخ‌های قلبی-عروقی مختلفی شود که خطر عمل جراحی را افزایش می‌دهند. این پاسخ‌ها، شامل اختلال عملکرد دیاستولیک به دلیل

۱- استاد، گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مصرف (خوراکی)، اوج اثر آن ۲-۱ ساعت و نیمه‌ی عمر آن ۱۵-۱۲ ساعت می‌باشد (۹).  
با توجه به این که کنترل فشار خون بالای بعد از عمل، مشکل است و نیز موجب افزایش هزینه‌های بیمار و تأخیر در ترخیص از ریکاوری می‌شود؛ این مطالعه با هدف بررسی اثر پیش‌داروی خوراکی آلپرازولام ۰/۵ میلی‌گرم بر روی کنترل فشار خون بیماران مبتلا به پرفشاری خون، قبل، حین و بعد از عمل و نیز در ریکاوری انجام شد.

### روش‌ها

این مطالعه، پس از تصویب پیش‌نویس طرح و اخذ موافقت کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، در مرکز آموزشی-درمانی الزهرای (س) اصفهان در سال ۱۳۹۳ به انجام رسید. ۹۸ بیمار به روش تصادفی‌سازی بلوکی انتخاب و به دو گروه ۴۸ نفره تقسیم شدند. برای گروه اول، نیم ساعت قبل از عمل یک قرص آلپرازولام ۰/۵ میلی‌گرم خوراکی تجویز شد. برای گروه شاهد، از هیچ دارویی استفاده نشد. پارامترهای فشار خون سیستولی و دیاستولی، قبل از القای بیهوشی، بعد از لوله‌گذاری تراشه و هر ۱۰ دقیقه یک بار حین بیهوشی، در دو گروه تعیین گردید. همچنین، تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و درصد اشباع اکسیژن قبل و حین عمل در دو گروه ثبت گردید. میزان مصرف مخدر و شدت درد در ریکاوری، مدت زمان اکستوباسیون و خروج از ریکاوری نیز ثبت گردید.

معیارهای ورود به مطالعه، شامل بیماران مبتلا به افزایش فشار خون اولیه‌ی تحت کنترل با داروهای ضد فشار خون که به شرکت در مطالعه تمایل داشتند، بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل ابتلا به

عصبی سمپاتیک و کاهش کنترل رفلکس گیرنده‌ی بارو کاهش می‌یابد. این تغییرات، می‌توانند در اپیزودهای کاهش فشار خون طی عمل جراحی دیده شوند. بیمارانی که از قبل پرفشاری خون دارند، با احتمال بیشتری، تغییرات طی عمل جراحی (افزایش و یا کاهش فشار خون) را تجربه می‌کنند که می‌تواند منجر به ایسکمی میوکارد قلب شود (۳-۴). اغلب بیمارانی که پرفشاری خون دارند، دچار کاهش فشار خون جدی بعد از القای بیهوشی و پاسخ‌های شدید فشاری به استرس‌هایی مثل لارنگوسکوپ‌ی، اینتوباسیون، برش جراحی و اکستوباسیون می‌شوند. افزایش فشار خون در تعقیب عواملی همچون تحفیف ناکافی درد و اتساع مثانه بیشتر می‌شود (۵).

فعالیت سمپاتیک طی القای بیهوشی، می‌تواند فشار خون را به میزان ۲۰-۳۰ میلی‌متر جیوه و ضربان قلب را به اندازه‌ی ۲۰-۱۵ ضربه در دقیقه، در بیمار با فشار خون طبیعی افزایش دهد (۶). این پاسخ، ممکن است در بیماران مبتلا به پرفشاری خون درمان نشده، به صورت افزایش ۹۰ میلی‌متر جیوه در فشار خون سیستولیک و افزایش ۴۰ ضربه در دقیقه برای ضربان قلب باشد (۲). بیماران دارای سابقه‌ی پرفشاری خون اولیه، در معرض بیشترین خطر برای پرفشاری خون سیستمیک قابل توجه در بخش ریکاوری می‌باشند (۷). علایمی وجود دارد که نشان می‌دهد بنزودیازپین‌ها می‌توانند نوسانات فشار خون را در بیمارانی که پرفشاری خون ناپایدار دارند، تثبیت کنند (۸). آلپرازولام یک بنزودیازپین است که از طریق دپرسیون سیستم عصبی مرکزی در سطح لیمبیک و زیر قشر مغز، اثر ضد اضطرابی خود را اعمال می‌کند. شروع اثر آن ۳۰-۱۵ دقیقه بعد از

## یافته‌ها

میانگین سن بیماران در گروه شاهد و مورد به ترتیب  $5/10 \pm 67/96$  و  $6/90 \pm 68/26$  بود که طبق آزمون t از لحاظ آماری، تفاوت معنی داری نداشت ( $P = 0/812$ ) (جدول ۱). در هر یک از گروه های شاهد و مورد، ۴۸ بیمار شامل ۲۴ زن و ۲۴ مرد بود که تفاوت معنی داری نداشت ( $P = 1/000$ ).

طبق جدول ۱، فشار خون سیستولی در دقایق ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ در گروه مورد به ترتیب  $142/64 \pm 5/78$ ،  $135/64 \pm 4/99$ ،  $137/30 \pm 6/60$  و  $141/54 \pm 7/67$  و در گروه شاهد به ترتیب  $149/85 \pm 5/37$ ،  $140/78 \pm 4/58$ ،  $149/59 \pm 7/12$  و  $148/48 \pm 6/5$  بود که طبق آزمون t تفاوت معنی داری میان دو گروه مشاهده شد ( $P = 0/001$ ). همچنین، میزان ضربان قلب، تعداد تنفس و اشباع اکسیژن در دو گروه، تفاوت معنی داری نداشت ( $P > 0/050$ ).

در دقایق ۵۰ تا ۱۰۰ جراحی، پارامترهای فشار خون، ضربان قلب، تعداد تنفس و اشباع اکسیژن، تفاوت معنی داری نداشت ( $P > 0/050$ ).

طبق جدول ۲ که نشان دهنده میزان مخدر دریافتی، زمان اکستوباسیون، خروج از ریکاوری و معیار VAS می باشد، شدت درد در گروه مورد و شاهد به ترتیب  $1/33 \pm 5/10$  و  $1/33 \pm 5/80$  بود که در گروه مورد به طور معنی داری کمتر بود ( $P = 0/120$ ). میزان مصرف مخدر در گروه مورد و شاهد به ترتیب  $15/49 \pm 23/64$  و  $12/12 \pm 34/14$  میلی گرم بر کیلوگرم بود که در گروه مورد، به طور معنی داری کمتر بود ( $P = 0/001$ ).

بیماری های ریوی، بروز علائم آلرژی مفرط به آلپرازولام در بیمار، فوت بیمار در حین عمل و یا در ریکاوری، عمل جراحی طولانی تر از ۲ ساعت و پیدایش خونریزی بیش از میزان مجاز با نیاز به جایگزینی خون بود.

القای بیهوشی در بیماران با تیوپنتال سدیم (۵ میلی گرم بر کیلوگرم)، آتروکوریوم (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم)، فنتانیل (۱/۵ میکروگرم بر کیلوگرم) و میدازولام (۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم) صورت گرفت و سپس ایتوباسیون انجام شد. میزان درد بیماران در ریکاوری با معیار VAS (Visual analog scale) اندازه گیری شد و در صورت  $VAS > 3$ ، پتیدین به میزان ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت وریدی (IV یا Intravenous) به بیمار تزریق می شد.

در صورت  $BP \geq 16/90$ ، میزان داروهای دریافتی برای کنترل فشار خون، حین عمل و در ریکاوری در پرسش نامه ثبت می شد. داده های مطالعه با استفاده از چک لیست تهیه شده به همین منظور جمع آوری گردید. این پرسش نامه، شامل اطلاعات عمومی و دموگرافیک بیماران و همچنین اطلاعات مربوط به فشار خون، سوابق بیماری و روند تغییرات فشار خون، ضربان قلب، اشباع اکسیژن و میزان حجم مایعات و داروهای مخدر تسکینی و کنترل فشار خون بود. اطلاعات به دست آمده، در نهایت وارد رایانه شد و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون t (جهت مقایسه ی داده های کمی شامل فشار خون، تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس، میزان درد، اشباع اکسیژن و میزان داروی مخدر مصرفی) استفاده گردید.

جدول ۱. مقایسه‌ی فشار خون سیستول، دیاستول، متوسط و ضربان قلب در زمان‌های مختلف

مقدار P	ضربان قلب		تعداد تنفس			فشار خون دیاستول			فشار خون سیستول			اشباع اکسیژن			
	مورد	شاهد	مورد	شاهد	مقدار P	مورد	شاهد	مقدار P	مورد	شاهد	مقدار P	مورد	شاهد		
۰/۸۸۱	۸۳/۲۹ ± ۴/۲۰	۸۳/۱۶ ± ۴/۲۰	۰/۸۱۷	۱۳/۳۰ ± ۱/۰۰	۱۳/۳۰ ± ۱/۰۵	۰/۹۶۰	۹۳/۲۰ ± ۴/۴۰	۹۳/۱۰ ± ۴/۴۰	۰/۶۸۹	۱۴۱/۸۰ ± ۳/۱۰	۱۴۱/۵۰ ± ۳/۳۰	۰/۷۹۶	۹۵/۴۰ ± ۲/۲۰	۹۵/۵۰ ± ۲/۱۰	قبل از شروع بیهوشی
۰/۹۴۲	۸۰/۰۰ ± ۶/۹۰	۸۰/۱۰ ± ۶/۷۰	۰/۶۲۶	۱۲/۴۰ ± ۱/۳۴	۱۲/۵۰ ± ۱/۳۸	۰/۹۰۳	۷۱/۴۰ ± ۱۲/۰۶	۷۱/۷۰ ± ۱۲/۰۹	۰/۹۰۷	۱۲۱/۳۰ ± ۱۵/۹۰	۱۲۱/۷۰ ± ۱۶/۲۰	۰/۹۰۴	۹۴/۰۰ ± ۲/۳۰	۹۳/۹۳ ± ۲/۷۰	لحظه‌ی بیهوشی
۰/۲۶۵	۹۳/۹۱ ± ۷/۰۰	۸۸/۱۴ ± ۷/۰۰	۰/۵۹۳	۱۰/۶۱ ± ۰/۰۰	۱۰/۵۲ ± ۰/۸۰	۰/۰۱۰	۹۳/۹۱ ± ۷/۰۰	۸۸/۱۴ ± ۷/۰۰	۰/۰۰۱	۱۴۹/۵۰ ± ۷/۱۰	۱۳۷/۳۰ ± ۶/۶۰	۰/۴۳۹	۹۶/۰۵ ± ۱/۸۰	۹۶/۸۰ ± ۱/۹۰	دقیقه‌ی ۱۰
۰/۲۸۰	۸۵/۲۰ ± ۴/۸۳	۸۳/۷۵ ± ۶/۴۴	۰/۵۸۶	۱۱/۰۰ ± ۱/۱۰	۱۰/۸۷ ± ۱۲/۱۰	۰/۰۳۸	۸۹/۹۱ ± ۵/۵۷	۸۷/۳۹ ± ۶/۰۷	۰/۰۰۱	۱۴۰/۷۰ ± ۴/۵۸	۱۳۵/۶۰ ± ۴/۹۹	۰/۲۰۱	۹۵/۰۴ ± ۴/۸۷	۹۶/۰۴ ± ۲/۲۴	دقیقه‌ی ۲۰
۰/۷۲۹	۸۵/۳۴ ± ۸/۱۸	۸۵/۹۳ ± ۸/۵۴	۰/۹۱۸	۱۰/۸۹ ± ۰/۷۸	۱۰/۸۷ ± ۰/۹۵	۰/۰۱۹	۹۳/۰۸ ± ۵/۵۹	۹۰/۰۴ ± ۶/۷۶	۰/۰۰۱	۱۴۹/۸۰ ± ۵/۳۷	۱۴۲/۶۰ ± ۵/۷۸	۰/۹۷۶	۹۴/۷۲ ± ۲/۳۰	۹۴/۷۰ ± ۲/۵۲	دقیقه‌ی ۳۰
۰/۷۴۸	۸۷/۱۹ ± ۶/۸۳	۸۶/۷۲ ± ۷/۱۱	۰/۶۹۰	۱۱/۵۹ ± ۱/۳۴	۱۱/۴۷ ± ۱/۴۸	۰/۱۸۰	۹۵/۹ ± ۸/۸۷	۹۱/۲۵ ± ۹/۹۶	۰/۰۰۱	۱۴۸/۴۰ ± ۶/۵۰	۱۴۱/۰۵ ± ۷/۶۷	۰/۷۳۹	۹۵/۶۳ ± ۲/۲۳	۹۵/۷۹ ± ۲/۲۴	دقیقه‌ی ۴۰
۰/۹۶۲	۹۰/۰۰ ± ۱۰/۵۰	۹۰/۰۰ ± ۱۰/۴۰	۰/۷۰۲	۱۱/۸۰ ± ۱/۲۰	۱۱/۷۰ ± ۱/۳۰	۰/۷۶۳	۹۵/۹۰ ± ۱۲/۵۰	۹۵/۱۰ ± ۱۲/۲۰	۰/۴۶۶	۱۵۰/۲۰ ± ۱۱/۹۰	۱۴۸/۰۰ ± ۱۲/۲۰	۰/۷۵۶	۹۵/۷۰ ± ۲/۴۲	۹۵/۵۴ ± ۲/۵۹	دقیقه‌ی ۵۰
۰/۷۶۱	۹۲/۷۰ ± ۸/۶۰	۹۲/۱۰ ± ۹/۱۰	۰/۶۶۸	۱۱/۲۰ ± ۰/۹۰	۱۱/۲۰ ± ۰/۱۰	۰/۰۹۰	۱۰/۱۰ ± ۸/۵۰	۹۸/۰۰ ± ۸/۵۰	۰/۲۵۹	۱۵۲/۶۰ ± ۷/۱۰	۱۵۰/۸۰ ± ۸/۶۰	۰/۶۵۹	۹۵/۲۰ ± ۲/۲۰	۹۵/۰۲ ± ۲/۴۰	دقیقه‌ی ۶۰
۰/۳۸۵	۹۱/۴۰ ± ۷/۷۰	۹۰/۰۸ ± ۷/۷۰	۰/۴۷۷	۱۱/۳۰ ± ۱/۲۰	۱۱/۱۰ ± ۱/۳۰	۰/۴۱۷	۹۶/۰۶ ± ۶/۶۰	۹۴/۹۰ ± ۶/۵۰	۰/۰۶۸	۱۵۵/۱۰ ± ۵/۴۰	۱۵۲/۹۰ ± ۶/۱۰	۰/۳۴۰	۹۴/۶۰ ± ۲/۴۰	۹۵/۰۶ ± ۲/۰۴	دقیقه‌ی ۷۰
۰/۹۶۰	۹۱/۴۰ ± ۱۱/۰۸	۹۱/۵۰ ± ۱۱/۴۰	۰/۲۱۴	۱۱/۳۰ ± ۱/۱۰	۱۱/۱۰ ± ۰/۹۷	۰/۶۰۴	۹۵/۱۰ ± ۹/۱۰	۹۴/۱۰ ± ۱۰/۳۰	۰/۶۰۸	۱۵۲/۳۰ ± ۱/۱۰	۱۵۱/۱۰ ± ۱۱/۸۰	۰/۷۹۶	۹۵/۴۰ ± ۲/۲۰	۹۵/۵۰ ± ۲/۱۰	دقیقه‌ی ۸۰
۰/۸۸۷	۸۹/۴۰ ± ۹/۴۰	۸۹/۱۰ ± ۹/۷۰	۰/۷۷۲	۱۱/۶۰ ± ۱/۲۰	۱۱/۵۰ ± ۱/۳۰	۰/۹۰۳	۹۵/۰۲ ± ۸/۹۰	۹۴/۷۰ ± ۹/۳۰	۰/۲۸۱	۱۴۹/۸۰ ± ۸/۶۰	۱۴۷/۹۰ ± ۸/۵۰	۰/۹۰۴	۹۴/۰۰ ± ۲/۳۰	۹۳/۹۰ ± ۲/۷۰	دقیقه‌ی ۹۰
۰/۷۹۸	۸۸/۱۰ ± ۵/۸۰	۸۷/۸۰ ± ۶/۱۰	۰/۷۷۳	۱۱/۱۰ ± ۱/۰۶	۱۱/۰۸ ± ۱/۱۰	۰/۷۷۱	۹۲/۹۰ ± ۶/۳۰	۹۲/۵۰ ± ۶/۷۰	۰/۷۲۱	۱۴۸/۳۰ ± ۵/۸۰	۱۴۷/۸۰ ± ۵/۸۰	۰/۷۹۸	۹۴/۴۰ ± ۲/۵۰	۹۴/۵۰ ± ۲/۶۰	دقیقه‌ی ۱۰۰

اعداد بر حسب میانگین ± انحراف معیار نوشته شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده آزمون t بود.  $P > ۰/۰۵۰$  معنی‌دار نبود.

جدول ۲. میانگین سن، میزان مخدر، شدت درد، زمان اکستوباسیون و خروج از ریکاوری

متغیر	مورد	شاهد	مقدار P
سن	۶۷/۹۶ ± ۵/۱۰	۶۸/۲۶ ± ۶/۹۰	۰/۸۱۲
میزان مخدر	۲۳/۶۴ ± ۱۵/۴۵	۳۴/۱۴ ± ۱۲/۱۲	۰/۰۰۱
زمان خروج لوله تراشه	۲۹/۶۴ ± ۵/۴۶	۲۹/۴۲ ± ۳/۸۰	۰/۸۲۱
زمان خروج از ریکاوری	۹۳/۸۳ ± ۳/۵۶	۹۴/۰۶ ± ۳/۲۱	۰/۷۴۱
شدت درد بر اساس VAS	۵/۱۴ ± ۱/۳۳	۵/۸۵ ± ۱/۳۳	۰/۱۲۰

اعداد بر حسب میانگین ± انحراف معیار نوشته شده‌اند. آزمون آماری مورد استفاده آزمون t بود.  $P > 0.050$  معنی دار نبود.

VAS: Visual analog scale

معنی داری در گروه مورد کمتر بود. همچنین، شدت درد و میزان مصرف مخدر نیز به طور معنی داری در گروه مورد کمتر بود.

نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بنزودیازپین‌ها به صورت پروپیلکسی می‌توانند اثرات قابل ملاحظه‌ای در کنترل فشار خون داشته باشند.

Divac و همکاران، در مطالعه‌ای نشان دادند که مصرف بنزودیازپین‌ها ارتباط نزدیکی با فشار خون دارد. بیمارانی که علاوه بر داروهای ضد فشار خون، بنزودیازپین نیز دریافت می‌کردند، به طور واضح تعداد اقلام دارویی ضد فشار خون کمتری در مقایسه با بیماران دریافت کننده‌ی درمان دارویی ضد فشار خون تنها داشتند (۱۰).

Kruse و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که مصرف بالای بنزودیازپین‌ها در کنترل فشار به خصوص در افراد مسن مؤثر است (۱۱). Dmitriev و همکاران در مطالعه‌ای اثبات کردند بنزودیازپین‌ها می‌توانند نوسانات فشار خون را در بیمارانی که پرفشاری خون ناپایدار دارند، تثبیت کنند (۸).

Divac و همکاران، در مطالعه‌ای به ارتباط بین بنزودیازپین‌ها و پرفشاری خون اشاره کردند و تأثیر دوز کم بنزودیازپین‌ها در کنترل فشار خون را در

مدت زمان اکستوباسیون در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب  $29/64 \pm 5/46$  و  $29/42 \pm 3/80$  دقیقه بود که تفاوت معنی داری نداشت ( $P = 0/820$ ). همچنین، مدت زمان خروج از ریکاوری در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب  $93/83 \pm 3/56$  و  $94/06 \pm 3/21$  دقیقه بود که تفاوت معنی داری در دو گروه مشاهده نشد ( $P = 0/741$ ).

## بحث

هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر پیش‌داروی خوراکی آلپرازولام بر کنترل فشار خون بیماران مبتلا به پرفشاری خون حین عمل جراحی بود. در این مطالعه، بیماران به دو گروه مورد و شاهد تقسیم شدند و فشار خون بیماران، ضربان قلب، تعداد تنفس، اشباع اکسیژن، شدت درد، میزان مخدر دریافتی، زمان اکستوباسیون و خروج از ریکاوری ثبت گردید.

میانگین سن بیماران و توزیع جنسی در دو گروه، تفاوت معنی داری نداشت که به احتمال زیاد، اثر مخدوش‌کنندگی آن را مهار نمود و نتایج به دست آمده را می‌توان به اثر داروی آلپرازولام ارتباط داد. طبق نتایج به دست آمده، افزایش فشار خون در ۴۰ دقیقه‌ی اول جراحی، به طور

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای مرتضی رضایی به شماره‌ی ۳۹۴۰۳۶ مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. با تشکر از مهندس مهرابی و کلیه‌ی کارکنان اتاق عمل بیمارستان الزهراء (س) اصفهان که ما را در انجام این طرح یاری کردند.

فوریت تحقیقات آینده قرار دادند (۱۲). نتیجه‌گیری نهایی این که مطالعات انجام گرفته در دنیا و مطالعه‌ی حاضر، نشان می‌دهند که استفاده از آلپرازولام به عنوان پیش دارو، می‌تواند از افزایش فشار حین عمل جراحی جلوگیری کند و از شدت درد و میزان مخدر مصرفی در ریکاوری بکاهد.

## References

1. Varon J, Marik PE. Perioperative hypertension management. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4(3): 615-27.
2. Kaplan NM. Perioperative management of hypertension. UpToDate [Online]. [cited 2015 Sep]; Available from: URL: <http://www.uptodate.com/contents/perioperative-management-of-hypertension>.
3. Goldman L, Caldera DL. Risks of general anesthesia and elective operation in the hypertensive patient. *Anesthesiology* 1979; 50(4): 285-92.
4. Prys-Roberts C. Anaesthesia and hypertension. *Br J Anaesth* 1984; 56(7): 711-24.
5. Foex P, Sear JW. The surgical hypertensive patient. *Continuing Education in Anaesthesia. Crit Care Pain* 2004; 4(5): 139-43.
6. Wolfsthal SD. Is blood pressure control necessary before surgery? *Med Clin North Am* 1993; 77(2): 349-63.
7. Nicholau D. The post anesthetic care unit. In: Miller RD. *Miller's anesthesia*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2010. p. 2717.
8. Dmitriev KV, Fedorova VI, Nedostup AV. Clonazepam in the treatment of labile arterial hypertension in the elderly. *Ter Arkh* 2001; 73(3): 58-61. [In Russian].
9. Ghamarian A. *Pharmaceutical Information of Iran*. Tehran, Iran: Ghamarian Publications; 2010.
10. Divac N, Veljkovic S, Nestic Z, Stojanovic R, Bajcetic M, Vasiljevic Z, et al. Pattern of utilization of benzodiazepines in patients with hypertension: a pilot study. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(4): 370-5.
11. Kruse W, Rampmaier J, Frauenrath-Volkers C, Volkert D, Wankmuller I, Micol W, et al. Drug-prescribing patterns in old age. A study of the impact of hospitalization on drug prescriptions and follow-up survey in patients 75 years and older. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 41(5): 441-7.
12. Divac N, Jasovic M, Djukic L, Vujnovic M, Babic D, Bajcetic M, et al. Benzodiazepines utilization and self-medication as correlates of stress in the population of Serbia. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2004; 13(5): 315-22.



## Cotimparave Evaluation of Oral Alprazolam, as Premedication, on Controlling Blood Pressure in Hypertensive Patients during Surgery

Parvin Sajedi MD<sup>1</sup>, Mortaza Rezaie<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** One of the major challenges in adult surgery is hypertension. Hypertensive patient are in danger of myocardial ischemia, increasing blood pressure in recovery room, kidney injury and cerebral artery damage. Regarding the previously reported positive effect of alprazolam in decreasing this complication, we decided to evaluate its efficacy in hypertensive patients undergoing surgery under general anesthesia.

**Methods:** The present randomized controlled trial was conducted in 2014 in Alzahra Hospital, Isfahan, Iran. Study subjects (age range between 54 and 76 years) were candidates for elective surgery under general anesthesia. Patients were randomly divided into 2 groups, intervention and control. Control group received no drug and intervention group received alprazolam tablet (0.5 mg) before the surgery. Systolic and diastolic blood pressure, heart rate, respiratory rate, pulse oximere, and O<sub>2</sub> saturation during the surgery and pain severity, extubation time, recovery time and the dose of analgesic drugs after the surgery were evaluated and compared between the groups.

**Findings:** Increasing blood pressure in the first 40 minutes of surgery ( $P = 0.001$ ), pain severity ( $P = 0.012$ ) and the dose of analgesic drugs ( $P = 0.001$ ) were significantly less in intervention group compared to the control group.

**Conclusion:** According to our results, alprazolam has an optimal efficacy in controlling blood pressure in hypertensive patients undergoing surgery and reducing pain severity in recovery room. In the absence of contraindications, it could be used as a prophylactic treatment in this group of patients.

**Keywords:** Alprazolam, Hypertension, Anesthesia induction, Post-anesthesia care unit (PACU)

**Citation:** Sajedi P, Rezaie M. Cotimparave Evaluation of Oral Alprazolam, as Premedication, on Controlling Blood Pressure in Hypertensive Patients during Surgery. J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1468-74

1- Professor, Department of Anesthesiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Parvin Sajedi MD, Email: sajedi@med.mui.ac.ir

## افزایش ایمنی زایی ساقه‌ی پروتئین هم‌گلوتینین ویروس انفلوانزا در همراهی با پروتئین شوک حرارتی Leishmania major، گامی در جهت ساخت واکسن واحد

سعیده صادقی نشاط<sup>۱</sup>، دکتر بهرخ فرهمند<sup>۲</sup>، دکتر زهرا کیان‌مهر<sup>۳</sup>، سمیه زمانی<sup>۴</sup>،  
مریم صالح<sup>۲</sup>، دکتر فاطمه فتوحی<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** ویروس انفلوانزا می‌تواند در انسان عفونت حاد تنفسی با شدت‌های متفاوت ایجاد کند که حتی در پاره‌ای از موارد، منجر به مرگ می‌شود. واکسن‌های موجود، شناساگر سر متغیر پروتئین هم‌گلوتینین است و بنا بر این، نیازمند به‌روزرسانی سالانه می‌باشد. به تازگی، تلاش‌های زیادی در جهت ساخت واکسن‌های وسیع‌الطیف بر مبنای آنتی‌ژن‌های حفاظت شده‌ی ویروس انفلوانزا انجام گرفته است. هدف از این مطالعه، ارزیابی ایمنی‌زایی زیرواحد HA2 ویروس انفلوانزای نوع A در مدل موشی بود.

**روش‌ها:** پروتئین نو ترکیب HA2 در باکتری Escherichia coli بیان و استخراج شد و با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل، تخلیص گردید. جهت حذف نمک‌های اضافی و اوره و بازگرداندن پروتئین به شکل اولیه، از روش دیالیز با شیب اوره کمک گرفته شد. موش‌های BALB/c شش تا هشت هفته‌ای، با پروتئین HA2 تنها و یا همراه با ادجوانت‌های HSP70<sub>221-604</sub> از Leishmania major و یا Freund، به صورت تحت جلدی واکسینه شدند. در ادامه، ایمنی هم‌مورال با آزمایش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) بررسی گردید و در نهایت، موش‌های هر گروه با ویروس PR8 چالش شدند.

**یافته‌ها:** در موش‌های دریافت کننده‌ی پروتئین HA2، همراه یا بدون ادجوانت، آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده بود. موش‌هایی که پروتئین HA2 را همراه با Freund دریافت کرده بودند، آنتی‌بادی اختصاصی با تیترا بالاتری تولید کردند. در حالی که، موش‌های دریافت کننده‌ی HA2 همراه با HSP70، در چالش با ویروس وحشی بهتر محافظت شده بودند.

**نتیجه‌گیری:** پروتئین‌های شوک حرارتی باعث القای پاسخ آنتی‌بادی شده، ایمنی ذاتی را نیز تحریک می‌کنند. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین HA2 به تنهایی و یا همراه با HSP70 قادر است، موش‌ها را در برابر چالش با دوز کشنده‌ی ویروس محافظت نماید و می‌تواند، به عنوان یک واکسن واحد در نظر گرفته شود.

**واژگان کلیدی:** ویروس انفلوانزا، هم‌گلوتینین، HA2، Freund، HSP70، Leishmania major

**ارجاع:** صادقی نشاط سعیده، فرهمند بهرخ، کیان‌مهر زهرا، زمانی سمیه، صالح مریم، فتوحی فاطمه. افزایش ایمنی زایی ساقه‌ی پروتئین هم‌گلوتینین ویروس انفلوانزا در همراهی با پروتئین شوک حرارتی Leishmania major، گامی در جهت ساخت واکسن واحد. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۹): ۱۴۸۶-۱۴۷۵

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- استادیار، آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

## مقدمه

ویروس انفلوانزا، یکی از علل عمده‌ی بیماری‌های واگیردار و حاد تنفسی در سراسر جهان است که پستانداران و پرندگان را درگیر می‌کند. این ویروس، از اعضای خانواده‌ی Orthomyxoviridae و دارای غشا و اسید ریونوکلیک قطعه قطعه با قطبیت منفی است. تغییرات مداوم آنتی‌ژنی در پروتئین‌های سطحی، این ویروس را قادر می‌سازد تا چندین بار میزبان خود را آلوده کند. بیماری انفلوانزا، سالیانه حدود یک میلیارد نفر از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد که از این میان، ۵۰۰۰۰۰-۳۰۰۰۰۰ مورد منجر به مرگ می‌شود (۱). ۱۰ پاندمی بزرگ در طی ۳۰۰ سال اخیر اتفاق افتاده است که از جمله‌ی آن‌ها، می‌توان به پاندمی‌های سال‌های ۱۹۱۸، ۱۹۵۷، ۱۹۶۸ و ۲۰۰۹ اشاره کرد که مرگ‌بارترین آن‌ها در سال ۱۹۱۸ بوده است (۲-۳).

هماگلوتینین، مهم‌ترین پروتئین در عفونت‌زایی ویروس و یک هموتریمر است که توسط قطعه‌ی شماره‌ی چهار اسید ریونوکلیک رمزدهی می‌شود و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، اغلب علیه اپی‌توپ‌های آن ساخته می‌شوند. همه‌گیری‌های ویروس انفلوانزا، به واسطه‌ی تغییرات آنتی‌ژنیک این پروتئین رخ می‌دهد (۴-۷، ۱).

هماگلوتینین، ابتدا به صورت یک پروتئین پیش‌ساز (HA0) ساخته و سپس دچار تغییرات پس از ترجمه می‌شود (۸) و در نهایت هر مونومر به دو پلی‌پپتید کوچک‌تر یعنی HA1 و HA2 شکسته می‌شود (۹). زیرواحد HA1 سر گلوبولار این پروتئین را تشکیل می‌دهد و بخش ساقه مانند و حفاظت شده‌ی هماگلوتینین HA2 نام دارد که انتهای

کربوکسیل این پروتئین، درون غشا جای گرفته و انتهای آمین آن به عنوان پپتید الحاقی شناسایی شده است (۸).

واکسیناسیون، یکی از بهترین راه‌های ایمن کردن جمعیت انسانی در مقابل اپیدمی‌ها و پاندمی‌های ویروس انفلوانزا است (۱۰). به دلیل تغییرات مداوم این ویروس، در حال حاضر واکسن انفلوانزا به صورت هر ساله و بر اساس سویه‌ی در گردش تولید می‌شود (۱۱). امروزه، محققین در تلاشند با تفکیک اجزای ویروس و حذف پروتئین‌های غیر اختصاصی، با تخلیص قسمت‌های آنتی‌ژنیک مشترک بین سویه‌های مختلف ویروس انفلوانزا، به سمت تولید واکسن‌های دایمی و امن‌تری گام بردارند که تمام سویه‌ها را تحت پوشش قرار دهد.

در پژوهش حاضر، به منظور دستیابی به یک واکسن زیرواحدی مناسب، بخش حفاظت شده‌ی پروتئین هماگلوتینین (HA2) ویروس انفلوانزای A/H1N1 پس از بیان در سیستم پروکاریوت تخلیص گردید و ایمنی‌زایی و حفاظت‌بخشی آن به تنهایی و همراه با دو ادجوانت Freund و پروتئین شوک حرارتی در مدل حیوانی بررسی شد.

پروتئین HSP70<sub>221-604</sub> از *Leishmania major* به کار رفته در این پژوهش، از خانواده‌ی پروتئین‌های شوک حرارتی است. این پروتئین‌ها که به شدت حفاظت شده هستند، در همه‌ی ارگانیزم‌های زنده از باکتری تا انسان یافت می‌شوند و به عنوان چاپرون عمل می‌کنند (۱۲). این پروتئین، قادر به تحریک تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی است و می‌تواند سبب رهاسازی کموکاین‌ها توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها و بلوغ سلول‌های دندریتیک شود (۱۳).

## روش‌ها

الف) تولید پروتئین نوترکیب HA2 در باکتری *Escherichia coli* پلاسمید بیانی کد کننده‌ی ساقه‌ی پروتئین هم‌گلوپتینین (PET-28a/HA2) که از قبل در آزمایشگاه تحقیقاتی انفلوانزای انستیتو پاستور ایران ساخته و بیان آن تأیید شده بود، تهیه گردید. ابتدا این پلاسمید، در باکتری *Escherichia coli* Top10 F' تکثیر داده شد. برای بیان پروتئین نوترکیب، سلول‌های باکتری میزبان *Escherichia coli* BL21-DE3 با به کارگیری روش شوک حرارتی، مستعد شدند و ۵۰۰ نانوگرم پلاسمید نوترکیب PET-28a/HA2 در آن ترانسفورم گردید. باکتری‌های نوترکیب حاصل، در پلیت‌های حاوی *LB agar* (Luria-bertani) واجد آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. کلونی‌های حاصل در ارلن‌های یک لیتری حاوی ۲۵۰ سی‌سی محیط کشت *LB Broth* و آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در گرم‌خانه‌ی شیکردار انکوبه گردیدند.

پس از حصول دانسیته‌ی نوری مناسب، القاگر (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) IPTG با غلظت یک میلی‌مولار به باکتری‌ها اضافه شد و شش ساعت بعد، محصول کشت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. بیان پروتئین نوترکیب HA2 با الکتروفورز تأیید شد.

ب) استخراج پروتئین نوترکیب HA2: پروتئین مورد نظر بعد از آزمون و خطاهای متعدد و بررسی نتایج چندین روش استخراج متفاوت، از سلول *BL21 Escherichia coli* به روش دناتوره و با استفاده از اوره‌ی ۸ مولار و با به کارگیری بافرهای

مختلف استخراج شد. روش به کار گرفته شده به شرح زیر است:

ابتدا رسوب باکتری در بافر LEW (NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار،  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ۵۰ میلی‌مولار) حاوی *Imidazole* ۵ میلی‌مولار و  $\text{pH} \sim 8$  شستشو داده شد و بعد از طی سه مرحله‌ی انجماد و ذوب، ۷ بار به مدت یک دقیقه با قدرت ۸۰ و پالس ۰/۵ سونیکه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی بعد، رسوب پروتئینی بار دیگر در بافر پیش‌گفته به علاوه‌ی Triton x-۱۰۰ حل شد و دوباره سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی سوم، جهت خارج کردن پروتئین HA2 از باقی‌مانده‌های سلولی، از بافر LEW حاوی اوره‌ی ۸ مولار استفاده شد. در این مرحله، پس از سونیکاسیون و قبل از سانتریفیوژ، سوسپانسیون حاصل در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۸۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. مایع رویی حاصل از مرحله‌ی نهایی که حاوی پروتئین HA2 بود، جهت تخلیص با ستون نیکل جمع‌آوری شد. در تمام مراحل، نمونه‌برداری صورت گرفت و نمونه‌ها با الکتروفورز بررسی گردید.

ج) تخلیص پروتئین نوترکیب HA2: تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون‌های *Ni-TED 2000 packed* (MN, Germany) و با اعمال تغییراتی در دستورالعمل مربوط صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا ستون دو بار (هر بار ۳ میلی‌لیتر) با آب مقطر دیونیزه و دو بار (هر بار ۳ میلی‌لیتر) با بافر LEW و  $\text{pH} \sim 8$  شستشو داده شد. آن

واکسیناسیون به صورت تحت جلدی در سه دوز و به میزان هر دوز ۱۵ میکروگرم و در فواصل دو هفته‌ای انجام شد. گروه اول پروتئین HA2، گروه دوم پروتئین HA2 همراه با پروتئین HSP و گروه سوم پروتئین HA2 را همراه با ادجوانت Freund، دو گروه نیز به عنوان شاهد HSP و یا PBS (Phosphate-buffered saline) دریافت کردند. دو هفته بعد از آخرین تزریق، از سینوس ارییتال موش‌ها خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جهت بررسی با الیزا جدا گردید.

ه) الیزا: به منظور ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین HA2 به تنهایی و یا همراه با ادجوانت‌های پیش‌گفته، میزان IgG (Immunoglobulin G) سرم‌های جمع‌آوری شده با روش الیزا بررسی گردید. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین HA2 رقیق شده با بافر فسفات نمکی ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) میکروگرم بر میلی‌لیتر) با pH ۷/۲ درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از شستشو، مسدودسازی چاهک‌ها با BSA (Bovine serum albumin) ۳ درصد انجام گرفت و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه گذاشته شد. سپس چاهک‌ها شسته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۲۰۰۰ مخلوط سرم‌های گروه‌های مختلف موش‌ها (جمع‌آوری شده در هفته‌ی سوم بعد از تزریق آخرین دوز واکسن)، در هر چاهک ریخته شد و پلیت برای ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سرم‌ها در PBS حاوی ۱ درصد BSA رقیق شدند.

در ادامه، بعد از مرحله‌ی شستشوی پلیت، در هر

گاه در چند مرحله، ۹ ml میلی‌لیتر از محصول استخراج بر روی ستون برده شد. به منظور بهره‌گیری از تمامی ظرفیت ستون، مایع خروجی از ستون (Flow through) چندین بار به ستون برگردانده شد. سپس برای حذف پروتئین‌های اضافی، ستون با بهره‌گیری از بافر LEW حاوی اوره (۱۲ میلی‌لیتر) شسته شد. در این مرحله، جهت جداسازی پروتئین HA2 از ستون، بافر LEW حاوی اوره ۸ مولار و Imidazole ۲۵۰ میلی‌مولار به کار گرفته شد و محلول عبوری از ستون در حجم‌های ۲۵۰ میکرولیتری جمع‌آوری شد و با ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ۱۲ درصد بررسی گردید. گفتنی است که در تمامی مراحل، به منظور افزایش کارایی ستون، سرعت عبور بافرها به میزان ۳ قطره در دقیقه تنظیم شد.

در ادامه، به منظور حذف نمک‌های اضافی و جلوگیری از رسوب پروتئین، از روش دیالیز در بافر فسفات با شیب اوره استفاده شد. برای این کار، پروتئین تخلیص شده علیه بافر فسفات واجد اوره‌ی ۴ مولار، ۲ مولار و ۱ مولار، هر کدام به مدت ۱ ساعت و سپس در بافر فسفات فاقد اوره و pH  $\sim 8.5$  به مدت یک شب دیالیز گردید. میزان خلوص پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی HA2 در نهایت با الکتروفورز روی ژل ۱۲ درصد و غلظت آن با روش Bradford برآورد گردید و تا هنگام تزریق در یخچال نگهداری شد.

د) برنامه‌ی واکسیناسیون: ۲۵ سر موش BALB/c ماده‌ی ۶-۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج خریداری و بعد از یک هفته نگهداری در بخش حیوان‌خانه، در ۵ گروه ۵-تایی مورد و شاهد تقسیم شدند.

## یافته‌ها

الف) تولید پروتئین نوترکیب HA2: پس از ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب PET-28a/HA2 در سویه‌ی بیانی مستعد شده‌ی (DE3) BL21، بیان این پروتئین در ارلن‌های حاوی ۲۵۰ سی‌سی محیط کشت مایع LB Broth در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت ۱ میلی‌مولار از IPTG و در ساعت ششم انجام گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی HA2 در تمامی ارلن‌ها به خوبی بیان شده است (شکل ۱- a).

در ادامه، استخراج پروتئین نوترکیب HA2 با روش دناتوره و اوره‌ی ۸ مولار، با بهره‌گیری از بافرهای مختلف و سونیکاسیون انجام گرفت و نتایج حاصل بر روی ژل الکتروفورز برده شد. همان‌گونه که در ستون هفتم شکل ۱- b مشاهده می‌شود، این پروتئین به مقدار مناسبی استخراج و بسیاری از پروتئین‌های اضافی در مراحل قبلی حذف گردیده است. در مرحله‌ی بعد، برای حذف کامل پروتئین‌های اضافی، از ستون کروماتوگرافی نیکل استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۱- c نشان داده شده پروتئین نوترکیب HA2 به میزان خوبی تخلیص شده است. در نهایت، جهت حذف نمک و اوره به منظور آماده‌سازی پروتئین برای تزریق، نمونه‌ی جمع‌آوری شده در مرحله‌ی قبل، علیه بافر فسفات با شیب اوره دیالیز گردید. بررسی ژل الکتروفورز مربوط نشان داد که پروتئین ۲۷ کیلودالتونی HA2 با درجه‌ی خلوص بیش از ۹۰ درصد تخلیص شده است (شکل ۱- d). همچنین، میزان پروتئین HA2 با آزمایش Bradford سنجیده شد و غلظت نهایی پروتئین تخلیص شده معادل ۰/۵۵ میکروگرم در هر میکرولیتر محاسبه شد.

یک از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه (HRP conjugated mouse antibody) با رقت ۱/۵۰۰۰ (رقیق شده با بافر فسفات نمکی حاوی ۱ درصد BSA) ریخته شد و برای ۱ ساعت دیگر درون انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در این مرحله، بعد از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB (3,3',5,5'-tetra methyl banzidine) به هر چاهک افزوده شد و ۲۰ دقیقه در فضای اتاق و در مکان تاریک گذاشته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال (به عنوان خاتمه دهنده‌ی واکنش) به محتویات هر چاهک افزوده و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

و) چالش حیوانات با ویروس کشنده‌ی H1N1: در این پژوهش به منظور چالش موش‌ها از ویروس H1N1 A/Puerto Rico/8/34 سازگار شده با موش استفاده شد. قبل از چالش، دوز کشنده‌ی ویروس در مدل موش BALB/c تعیین گردید. بدین منظور، ۴ گروه ۴ تایی از موش‌های BALB/c توسط زایلوزین/کتامین نیمه هوشیار شدند و با رقت‌های مختلف ( $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$  و  $10^{-4}$ ) ویروس PR8 به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از طریق بینی تلقیح شدند. موش‌های هر گروه در قفس‌های جداگانه به مدت ۲ هفته زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی، نگهداری شدند و روزانه از نظر بروز آثار بیماری و یا مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند.

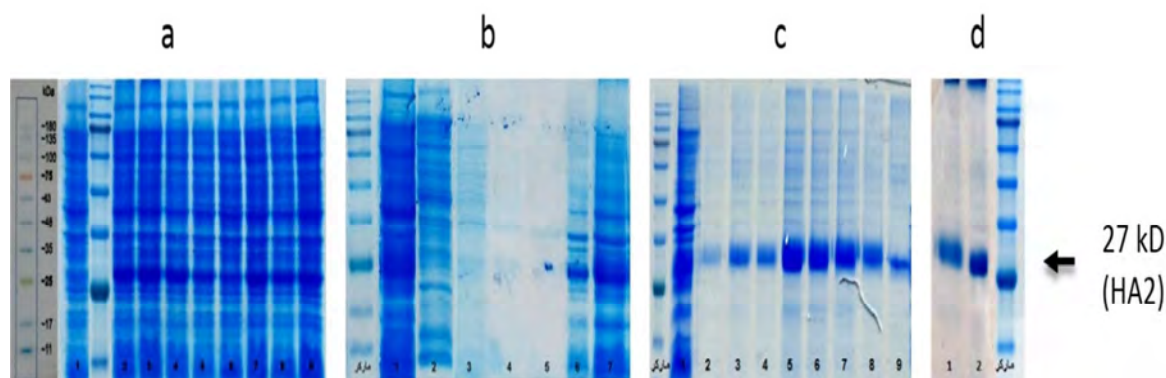
جهت چالش، تمامی موش‌های واکسینه شده (مورد و شاهد) دو هفته بعد از تزریق سوم با یک دوز کشنده از ویروس PR8 به روشی که در بالا ذکر شد تلقیح گردیدند و به مدت دو هفته مرگ و میر و کاهش وزن آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

کرده بودند، آنتی‌بادی اختصاصی بیشتری تولید شده بود؛ هر چند این تفاوت معنی‌دار نبود.

ج) چالش حیوانات با ویروس کشنده‌ی H1N1: قبل از چالش حیوانات واکسینه، دوز کشنده‌ی ویروس در موش‌های BALB/c مطابق روش گفته شده اندازه‌گیری شد. با توجه به این که در رقت  $10^{-3}$  از ویروس PR8، ۱۰۰ درصد حیوان‌ها مرده و در رقت بعدی تمام موش‌ها زنده ماندند، رقت  $10^{-3}$  به عنوان LD90 (رقتی که بتواند بیش از ۹۰ درصد حیوانات را بکشد) در نظر گرفته شد.

۲ هفته بعد از آخرین مرحله‌ی واکسیناسیون، موش‌های هر گروه، ۱۰۰ میکرولیتر از دوز کشنده‌ی ویروس را از طریق بینی دریافت کردند. موش‌ها به مدت ۲ هفته از نظر کاهش وزن و مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در شکل ۳-a و ۳-b آمده است.

ب) اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد HA2 به روش الیزا در موش‌های مورد مطالعه: ۲ هفته پس از آخرین دوز واکسن، از تمام حیوانات خون‌گیری به عمل آمد و میزان آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین HA2 با آزمایش الیزا اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، هر سه گروه دریافت‌کننده‌ی HA2 به تنهایی و یا همراه با ادجوانت‌های Freund و پروتئین HSP70، دارای پاسخ IgG علیه پروتئین HA2 هستند. آنالیز مقادیر به دست آمده با آزمون آماری One way ANOVA نشان داد که تولید آنتی‌بادی IgG در هر سه گروه دریافت‌کننده‌ی واکسن نسبت به گروه‌های شاهد (دریافت‌کننده‌ی PBS و HSP) تفاوت معنی‌داری ( $P < 0/0001$ ) دارند. همان‌طور که در شکل ۲ آمده است، در موش‌های ایمن شده با HA2 به همراه ادجوانت‌های Freund یا پروتئین HSP70، نسبت به موش‌هایی که فقط HA2 دریافت



شکل ۱. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از بیان، استخراج و تخلیص پروتئین نوترکیب HA2

a. بیان pET-28a/HA2 در باکتری *Escherichia coli* سویه‌ی BL21 (DE3)، ستون ۱: نمونه‌ی باکتری قبل از القا با IPTG، ستون‌های ۲-۹: نمونه‌ی باکتری در ارلن‌های ۱-۸، ۶ ساعت بعد از القا با IPTG

b. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از استخراج پروتئین HA2 از باکتری *Escherichia coli* سویه‌ی BL21 (DE3). ستون ۱: نمونه‌ی باکتری قبل از استخراج پروتئین HA2، ستون‌های ۲-۵: مراحل شستشوی پروتئین‌های اضافی، ستون‌های ۶ و ۷: محصول نهایی استخراج پروتئین HA2

c. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از تخلیص پروتئین HA2 توسط ستون Ni-TED. ستون ۱: نمونه‌ی جمع‌آوری شده از ستون بعد از بارگذاری نمونه، ستون‌های ۲-۹: الوشن حاوی پروتئین تخلیص شده HA2 توسط ستون نیکل.

d. الکتروفورز نمونه‌ی حاصل از دیالیز پروتئین HA2. ستون ۱: پروتئین HA2 تخلیص شده با ستون نیکل قبل از دیالیز، ستون ۲: پروتئین HA2 بعد از دیالیز.

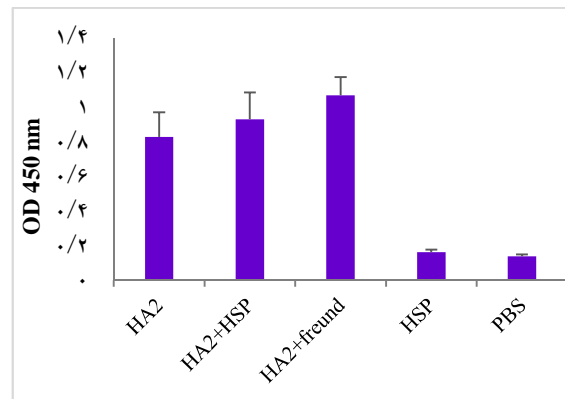
شکل ۳- b، موش‌های باقی‌مانده‌ی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی واکسن یک روند رو به بهبود و افزایش وزن را نشان دادند. این در حالی است که در گروه‌های شاهد دریافت‌کننده‌ی HSP و PBS چالش شده با H1N1، میزان تلفات ۱۰۰ درصد بود.

### بحث

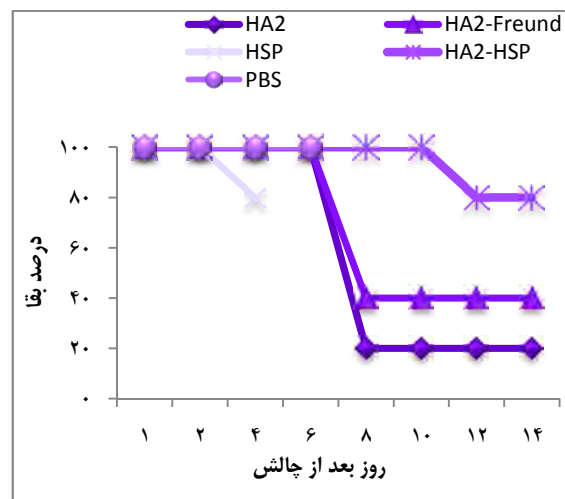
هر ساله، اپیدمی‌های انفلوانزا سبب بیماری‌های شدید و مرگ و میر در سراسر جهان می‌گردد (۱). با این حال، هیچ پیشگیری مؤثری علیه عفونت این ویروس تا کنون ایجاد نشده است. جهش‌زایی و نوتریبی غیر قابل پیش‌بینی ویروس انفلوانزای نوع A و ظهور تنوع‌های جدیدی که از سیستم ایمنی فرار می‌کنند، باعث مقاومت این ویروس در برابر اقدامات پیشگیری‌کننده و ایجاد اپیدمی‌ها و پاندمی‌های عمومی دوره‌ای می‌شود و جمعیت انسان‌ها را تهدید می‌کند (۱۴).

واکسن‌هایی که امروزه موجود هستند، باعث القای آنتی‌بادی‌هایی علیه نژادهای فصلی دارای مناطق آنتی‌ژنی با شباهت زیاد می‌شوند، اما علیه تنوع‌های جدید ویروس ناکارآمد هستند. بنا بر این، تلاش‌های تحقیقاتی زیادی که در سال‌های اخیر انجام گرفته است، به دنبال یافتن راهی برای تولید یک واکسن واحد هستند که در برابر نژادهای ویروسی دارای زیرنوع‌های مختلف HA حفاظت ایجاد کند و جهت پیش‌گیری از اپیدمی‌ها و حتی پاندمی‌های احتمالی نیز مؤثر واقع شود (۱۴).

یک واکسن انفلوانزای ایده‌آل، واکسنی است که ایمن و دارای قدرت اثرگذاری طولانی و اثر حفاظت‌بخشی در برابر نژادهای مختلف ویروس



شکل ۲. نتایج مربوط به اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های ویژه‌ی HA2 با روش الایزا. در این روش، رقت ۱/۲۰۰۰ سرم موش‌های مورد مطالعه با یکدیگر مقایسه شده است.  
PBS: Phosphate-buffered saline



شکل ۳. نتایج چالش موش‌های واکسینه با ویروس. a. میزان بقا در موش‌های واکسینه شده بعد از چالش با H1N1. b. میزان تغییرات وزنی موش‌های گروه‌های مختلف بعد از چالش با ویروس H1N1

PBS: Phosphate-buffered saline

در این مطالعه، در موش‌های دریافت‌کننده‌ی HA2 هنگام چالش با ویروس PR8 (H1N1)، ۸۰ درصد مرگ اتفاق افتاد. حال آن که در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی HA2-Freund و HA2-HSP، به ترتیب ۴۰ و ۸۰ درصد موش‌های چالش شده با ویروس زنده ماندند (شکل ۳- a). همچنین، بنا بر



واکنش‌گر با چندین زیرنوع HA می‌شود و علیه عفونت ویروس انفلوانزا حفاظت ایجاد می‌کند (۲۲). همچنین، همراهی ادجوانت Imiquimode باعث افزایش ایمنی‌زایی و حفاظت‌بخشی اسید آمینه‌های ۳۴۰-۵۶۰ پپتید HA2 شد (۲۳). از این رو، می‌توان انتظار داشت که پروتئین HA2 بتواند به عنوان یک هدف اساسی برای تولید واکسن زیرواحدی دارای حفاظت گسترده علیه زیرنوع‌های مختلف ویروس انفلوانزای نوع A، استفاده شود (۲۴).

بنا بر این، در مطالعه‌ی حاضر طراحی واکسن زیرواحدی بر مبنای ناحیه‌ی حفاظت‌شده‌ی پروتئین هم‌گلویتینین مد نظر قرار گرفت. پروتئین HA2 از قبل در آزمایشگاه تحقیقاتی انفلوانزا در میزبان باکتریایی بیان و با روش Western blot تأیید شده بود. در تحقیق حاضر، پروتئین HA2 بعد از بیان در مقیاس زیاد، استخراج و تخلیص گردید. به دلیل تشکیل اینکلوژن‌بادی، استخراج به روش دنا توره و با کمک گرفتن از نمک‌های مختلف و اوره‌ی ۸ مولار انجام گرفت. عمل تخلیص پروتئین HA2 که واجد دنباله‌ی هیستیدینی بود، با کمک گرفتن از ستون کروماتوگرافی نیکل انجام شد. به علت نامحلول بودن پروتئین در شرایط بازی، جهت حذف نمک‌های اضافی، از روش دیالیز در شیب اوره‌ی ملایم استفاده شد. دیالیز پروتئین‌ها در شیب اوره‌ی ملایم، باعث کاهش رسوب پروتئین بعد از جداسازی اوره می‌شود و از به هم ریختن ساختار پروتئین جلوگیری می‌نماید. بافر فسفات مورد استفاده فقط حاوی دو نمک  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  و  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  است. به دلیل حساسیت پروتئین‌ها به pH، حلالیت HA2 در pHهای ۴-۹، بررسی شد و مشخص گردید این

باشد. در این زمینه، زیرواحد کوچک هم‌گلویتینین (HA2) که شامل ساقه و فیوژن پپتید است و از نظر آنتی‌ژنی نسبت به سرکروی مولکول حفاظت‌شده است، کاندیدای امیدبخشی برای آماده‌سازی واکسن واحد است (۱۴). توالی ناحیه‌ی HA2 دارای ۸۵ درصد همولوژی در میان زیرنوع‌های مختلف ویروس انفلوانزا و ۹۵ درصد همولوژی در میان سویه‌های مختلف یک زیرنوع است و می‌تواند پاسخ‌های ایمنی متقاطع ایجاد کند (۱۵).

چهار منطقه‌ی آنتی‌ژنیک متفاوت در پپتید HA2 شناسایی شده است. آنتی‌بادی‌هایی که سه تا از این مناطق را شناسایی کنند، قادرند به طور گسترده‌ای ایمنی متقاطع ایجاد نمایند. این مناطق، شامل ناحیه‌ی پپتید الحاقی (رزیدوهای ۱-۳۸ از سمت N ترمینال)، ناحیه‌ی اکتودامین HA2 (اسید آمینه‌های ۱۸۵-۲۳ سمت N ترمینال) و قسمت ایمونوژنیک داخلی (رزیدوهای ۱۷۵-۱۲۵) است (۱۶-۱۷). پتانسیل حفاظت‌بخشی این نواحی با روش‌های مختلف توسط گروه‌های تحقیقاتی گوناگونی بررسی و مشاهده شده است که موش‌های واکسینه شده با این نواحی، بعد از چالش با ویروس، بیماری خفیف‌تر و مرگ و میر کمتری خواهند داشت (۱۷-۲۰).

پژوهش‌های صورت گرفته نشان داده است که با وجود پوشیده شدن HA2 توسط HA1 در ویروس طبیعی، هنگام مواجهه‌ی انسان و موش با عفونت انفلوانزا، آنتی‌بادی‌های ضد HA2 نیز تولید می‌شوند (۲۱). Steel و همکاران نشان دادند که با حذف سرگلوبولار HA1، ایمنی‌زایی گلیکوپروتئین HA2 افزایش می‌یابد؛ به طوری که واکسیناسیون موش‌ها با هم‌گلویتینین فاقد سر، باعث ایجاد آنتی‌بادی‌های

پروتئین در  $\text{pH} \sim 8/5$  بیشترین حلالیت را دارد. بنا بر این، جهت دیالیز پروتئین مورد نظر از این  $\text{pH}$  استفاده گردید.

به منظور ارزیابی ایمنی‌زایی پروتئین تولید شده، از مدل موشی استفاده شد. نتایج ایمن‌سازی موش‌های BALB/c نشان داد که پروتئین نوترکیب HA2 به تنهایی قادر است به خوبی سیستم ایمنی را تحریک کند و القای آنتی‌بادی‌های ویژه را راه‌اندازی نماید.

هدف از واکسیناسیون، ایجاد ایمنی حفاظتی است؛ در برخی از واکسن‌ها به ویژه واکسن‌های پپتیدی، همراهی یک ادجوانت مناسب، باعث افزایش ایمنی می‌شود. ادجوانت‌ها در بسیاری از واکسن‌ها استفاده می‌شوند، اما مکانیسم عمل آن‌ها به طور کامل شناخته نشده است (۲۵). در این پژوهش، میزان تولید آنتی‌بادی اختصاصی و افزایش ایمنی‌زایی پروتئین HA2 با همراه کردن Freund و پروتئین HSP70 به عنوان ادجوانت، بررسی گردید.

ادجوانت Freund یک امولسیون آب در روغن است که آنتی‌ژن را در شکل مایع به کمک یک ماده‌ی امولسیون‌ساز وارد روغن پارافین سبک وزن می‌کند و با ایجاد ذخیره‌ی کوتاه مدت آنتی‌ژن در محل تزریق، تولید مداوم آنتی‌بادی‌های قوی را تحریک می‌کند (۲۶-۲۷). کاربرد این ادجوانت، به دلیل اثرات جانبی زیاد آن، در واکسن‌های انسانی امکان‌پذیر نیست و در این مطالعه، از این ادجوانت به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

ادجوانت دیگر مورد استفاده در این پژوهش، پروتئین نوترکیب Leishmania major HSP70<sub>221-604</sub> بود که در بخش انفلوانزای انیستیتو پاستور ایران استخراج و تخلیص شد و برای پژوهش حاضر

استفاده گردید. مطالعات نشان داده است که ناحیه‌ی کد کننده‌ی اسید آمینه‌های ۶۰۴-۲۲۱ پروتئین Leishmania major HSP70 در مقایسه با قطعات C و N ترمینال آن باعث القای بهتر پاسخ‌های ایمنی همورال می‌شود (۲۶). پروتئین‌های شوک حرارتی با ارایه کردن آنتی‌ژن از طریق گیرنده‌های CD91 به سلول‌های ارایه کننده‌ی آنتی‌ژن، در کنار عمل MHC-I (Major histocompatibility complex-I) باعث تحریک CD8<sup>+</sup> T-Cellها و پاسخ آنتی‌بادی می‌شود. همچنین، HSP می‌تواند از طریق CD40، TLR2 و TLR4 و نیز القای ترشح سایتوکاین، ایمنی ذاتی را تحریک نماید.

نتایج نشان داد میزان آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده در موش‌های دریافت کننده‌ی Freund و یا پروتئین HSP70 به عنوان ادجوانت همراه با پروتئین HA2، نسبت به گروه دریافت کننده‌ی HA2، بیشتر بود.

اثر حفاظت‌بخشی پروتئین HA2 تولید شده در این پژوهش به تنهایی و یا در همراهی با ادجوانت‌های Freund و HSP70 در چالش با ویروس کشنده‌ی PR8 مورد ارزیابی قرار گرفت. این ویروس سویه‌ی H1N1 از ویروس انفلوانزا است و اولین بار در سال ۱۹۳۴ میلادی در منطقه‌ی پورتوریکو (Puerto Rico) آمریکا از بیمار مبتلا به انفلوانزا جداسازی شده است. تکثیر بالا در تخم‌مرغ و سلول MDCK (Madin-Darby canine kidney) از مزیت‌های این سویه نسبت به سایر سویه‌ها است. نظر به این که این ویروس‌ها در موش سازگار می‌شوند، بدون ایجاد عوارض بیماری‌زایی در انسان، باعث مرگ و میر در موش می‌شوند. از این رو، در تحقیقات آزمایشگاهی به خصوص در طراحی

نتایج به دست آمده در این پژوهش، با مطالعات دیگر انجام شده در این راستا همخوانی دارد (۲۸، ۲۳-۲۲، ۱۶، ۱۴). گرچه به کارگیری این پروتئین در راستای تولید واکسن واحد، مستلزم انجام آزمایش‌های مکمل و گسترده‌تری است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی سعیده صادقی نشاط دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بوده است و تمامی بودجه‌ی این پژوهش از محل طرح شماره‌ی ۶۱۱ انستیتو پاستور ایران تأمین گردیده است. لازم است از خانم حدیثه شکوهی و کلیه‌ی همکاران آزمایشگاه تحقیقات انفلوانزای انستیتو پاستور ایران که در به ثمر رسیدن این پژوهش ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

واکسن، از سویه‌ی PR8 به عنوان سویه‌ی چالش استفاده می‌گردد.

نتایج نشان داد، گروه‌های موشی واکسینه شده با پروتئین HA2 به تنهایی و یا به همراه ادجوانت‌های Freund و یا HSP70، هنگام رویارویی با دوز کشنده‌ی ویروس H1N1، به ترتیب ۲۰، ۴۰ و ۸۰ درصد بقا داشتند. در حالی که تمام موش‌های گروه‌های شاهد اعم از PBS و یا HSP، در چالش با ویروس از بین رفتند. در ضمن، بررسی‌های وزنی موش‌های چالش شده، یک روند رو به بهبود را در گروه‌های واکسینه شده با HA2 و HA2-HSP نشان می‌دهد.

بنا بر این، می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین نوترکیب HA2 قابلیت ایجاد ایمنی‌زایی در موش BALB/c را دارد و این ایمنی‌زایی، در اثر همراهی با ادجوانت‌های Freund و HSP70 افزایش می‌یابد. همچنین، پروتئین HA2 می‌تواند حیوانات را در مقابل چالش با ویروس کشنده حفاظت نماید. البته،

### References

1. Lambert LC, Fauci AS. Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med* 2010; 363(21): 2036-44.
2. Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, et al. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* 2001; 6(2): 87-97.
3. Okuda K, Ihata A, Watabe S, Okada E, Yamakawa T, Hamajima K, et al. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine* 2001; 19(27): 3681-91.
4. Kim CS, Epand RF, Leikina E, Epand RM, Chernomordik LV. The final conformation of the complete ectodomain of the HA2 subunit of influenza hemagglutinin can by itself drive low pH-dependent fusion. *J Biol Chem* 2011; 286(15): 13226-34.
5. Kim JI, Lee I, Park S, Park MS. Surface glycoproteins determine the feature of the 2009 pandemic H1N1 virus. *BMB Rep* 2012; 45(11): 653-8.
6. Reichert T, Chowell G, Nishiura H, Christensen RA, McCullers JA. Does Glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza? *BMC Infect Dis* 2010; 10: 5.
7. Peiris JS, Tu WW, Yen HL. A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. *Eur J Immunol* 2009; 39(11): 2946-54.
8. Fujiyoshi Y, Kume NP, Sakata K, Sato SB. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J* 1994; 13(2): 318-26.
9. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med* 2000; 51: 407-21.
10. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002; 20(25-26): 3068-87.

11. Ebrahimi SM, Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. *Virus Genes* 2011; 42(1): 1-8.
12. Black RA, Rota PA, Gorodkova N, Klenk HD, Kendal AP. Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. *J Gen Virol* 1993; 74 ( Pt 1): 143-6.
13. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet* 2003; 362(9397): 1733-45.
14. Stanekova Z, Vareckova E. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology* 2010; 7: 351.
15. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79(5): 2814-22.
16. Stanekova Z, Mucha V, Sladkova T, Blaskovicova H, Kostolansky F, Vareckova E. Epitope specificity of anti-HA2 antibodies induced in humans during influenza infection. *Influenza Other Respir Viruses* 2012; 6(6): 389-95.
17. Vareckova E, Mucha V, Kostolansky F. HA2 glycopolypeptide of influenza A virus and antiviral immunity. *Acta Virol* 2013; 57(2): 247-56.
18. Horvath A, Toth GK, Gogolak P, Nagy Z, Kurucz I, Pecht I, et al. A hemagglutinin-based multi-peptide construct elicits enhanced protective immune response in mice against influenza A virus infection. *Immunol Lett* 1998; 60(2-3): 127-36.
19. Okuno Y, Matsumoto K, Isegawa Y, Ueda S. Protection against the mouse-adapted A/FM/1/47 strain of influenza A virus in mice by a monoclonal antibody with cross-neutralizing activity among H1 and H2 strains. *J Virol* 1994; 68(1): 517-20.
20. Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen LM, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(3): 265-73.
21. Kostolansky F, Mucha V, Slovakova R, Vareckova E. Natural influenza A virus infection of mice elicits strong antibody response to HA2 glycopolypeptide. *Acta Virol* 2002; 46(4): 229-36.
22. Steel J, Lowen AC, Wang TT, Yondola M, Gao Q, Haye K, et al. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio* 2010; 1(1): e00018-10.
23. To KK, Zhang AJ, Chan AS, Li C, Cai JP, Lau CC, et al. Recombinant influenza A virus hemagglutinin HA2 subunit protects mice against influenza A(H7N9) virus infection. *Arch Virol* 2015; 160(3): 777-86.
24. Kang SM, Song JM, Compans RW. Novel vaccines against influenza viruses. *Virus Res* 2011; 162(1-2): 31-8.
25. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 2013; 4: 114.
26. Rafati S, Gholami E, Hassani N, Ghaemimanesh F, Taslimi Y, Taheri T, et al. Leishmania major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine* 2007; 25(21): 4159-69.
27. Foumani M, Asadpour L, Azizi Saraji A, Sharifat Salmani A, Aghasadeghi MR. Adjuvants and their mechanisms of action. *J Ardabil Univ Med Sci* 2012; 12(3): 276-91. [In Persian].
28. Janulikova J, Stanekova Z, Mucha V, Kostolansky F, Vareckova E. Two distinct regions of HA2 glycopolypeptide of influenza virus hemagglutinin elicit cross-protective immunity against influenza. *Acta Virol* 2012; 56(3): 169-76.

## Immunogenesis Enhancement of Influenza Virus Stalk Domain Using Leishmania Major Heat Shock Protein, One Step Closer to Universal Vaccine

Saeideh Sadeghi Neshat MSc<sup>1</sup>, Behrokh Farahmand PhD<sup>2</sup>, Zahra Kianmehr PhD<sup>3</sup>,  
Somayeh Zamani MSc<sup>3</sup>, Maryam Saleh MSc<sup>3</sup>, Fatemeh Fotouhi PhD<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Influenza viruses cause acute respiratory infections in humans, which can often be accompanied by pandemics with varying rates of illness and even a fatal end. Current vaccines target the variable globular part of hemagglutinin (HA); so, their effectiveness is limited and they need perpetual updating. To prepare universal vaccine, scientists' effort is focused on conserved antigenic parts of influenza virus such as hemagglutinin stalk domain which is more conserved compare to its globular head. The aim of this study was evaluating the immunogenicity of influenza A (H1N1) HA2 peptide in mouse model.

**Methods:** To prepare HA2 protein, the expression vector encoding the gene of interest (PET-28a/HA2), was transformed into Escherichia coli BL21-DE3 competent cells. Recombinant HA2 protein was extracted and purified using Ni-TED columns under denaturing conditions, refolded and desalted via step-wise dialysis. The HA2 concentration was determined via using Bradford protein assay. Six-week-old BALB/c mice in different groups were immunized intradermally with HA2 alone or supplemented with Freund or Lm.HSP70<sub>221-604</sub> as adjuvants. Two groups were injected with HSP70 and phosphate buffered saline (PBS) as negative controls. Humeral immunity in vaccinated mice was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); and finally, mice were challenged with one lethal dose (LD90) of PR8 virus.

**Findings:** The protein expression, extraction and purification stages were confirmed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis. The highest antibody response was measured in mice vaccinated with HA2-Freund, as expected. Specific antibody response in group received HA2-HSP70 was of higher titer than HA2 alone. More over HA2-HSP70 group surprisingly showed higher level of protection against lethal H1N1 (PR8) challenge compared to other groups.

**Conclusion:** It has been proved that HSP70 can induce specific response and innate immunity via stimulating CD8+ T-Cells, CD40, TLR2, TLR4 and cytokine secretion. Our results showed that HA2 alone or supplemented with HSP70 protected mice against lethal influenza challenge and could be considered as a universal vaccine.

**Keywords:** Influenza virus, Hemagglutinin, HA2 peptide, Freund adjuvant, Leishmania major HSP70

**Citation:** Sadeghi Neshat S, Farahmand B, Kianmehr Z, Zamani S, Saleh M, Fotouhi F. **Immunogenesis Enhancement of Influenza Virus Stalk Domain Using Leishmania Major Heat Shock Protein, One Step Closer to Universal Vaccine.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1475-86

1- Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Influenza Research Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Fatemeh Fotouhi PhD, Email: fotouhi@pasteur.ac.ir

## وضعیت نظام مراقبت بیماری سرخک در کشور ایران در سال ۱۳۹۳

سلیمان خزایی<sup>۱</sup>، حمید صالحی نیا<sup>۲</sup>، رضا پاکزاد<sup>۳</sup>، عبدالله محمدیان هفشجانی<sup>۴</sup>

### نامه به سردبیر

#### سردبیر محترم مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سرخک یکی از بیماری های حاد و بسیار مسری است که در سطح جهان یکی از عوامل عمده مرگ و میر در کودکان به ویژه کودکان دچار سوء تغذیه است. هر چند این بیماری قابل پیشگیری با واکسن است، اما به دلیل عوارض ناشی از عفونت به عنوان پنجمین علت مرگ در کودکان زیر ۵ سال مطرح می باشد (۱).

در ایران قبل از اجرای برنامه ایمن سازی همگانی، موارد سالانه ی سرخک تا ۱۵۰۰۰۰ نفر در سال های غیر اپیدمی و ۵۰۰۰۰۰ نفر در سال های اپیدمی گزارش شده است. اطلاعات سیستم مراقبت بیماری سرخک در کشور، بیانگر کاهش شدید موارد بروز بیماری در کشور بوده است؛ به نحوی که میزان بروز بیماری از ۱۲ در ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت در سال های قبل از انجام واکسیناسیون سراسری سرخک و سرخجه، به میزان ۱/۴ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۱۳۸۶ رسیده است (۲).

یکی از مهم ترین اهداف نظام مراقبت بیماری ها، شناسایی اپیدمی ها، پایش روند بیماری ها و شناسایی گروه های در معرض خطر می باشد. از این رو، حساسیت بالای نظام مراقبت به منظور شناسایی تمام موارد بیماری، حایز اهمیت است و موارد مظنون به بیماری نیز می بایست گزارش گردند (۳). بر اساس تعریف سازمان جهانی بهداشت، هر فرد بیمار با تب و راش پوستی و یکی از سه علامت سرفه، آبریزش بینی و کونژکتیویت به عنوان مورد مشکوک به سرخک تلقی می شود که به منظور انجام آزمایش های تکمیلی می بایست پیگیری شود (۴). از جمله شاخص های نظام مراقبت بیماری سرخک در مرحله ی حذف بیماری، کشف و گزارش دهی حداقل ۲ مورد مشکوک به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت می باشد.

همچنین، جهت تأیید آزمایشگاهی بیماری، باید حداقل از ۸۰ درصد موارد مشکوک شناسایی شده، نمونه (خون، گلو و ادرار) تهیه و بررسی گردد. در

۱- کارشناس ارشد، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲- پژوهشگر، مرکز تحقیقات جراحی های کم تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران و دانشجوی دکتری، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- اپیدمیولوژیست، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان و دانشجوی دکتری، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده ی مسؤول: عبدالله محمدیان هفشجانی  
Email: amohamadii1361@gmail.com

مرحله‌ی حذف بیماری سرخک، باید موارد تأیید شده‌ی بیماری، به کمتر از ۱ مورد در ۱۰۰۰۰۰۰ نفر (به استثنای موارد تأیید شده‌ی وارده) برسد (۲). عملکرد نظام مراقبت کشور در خصوص بیماری سرخک در سال ۱۳۹۳، شامل جمعیت کشور ۷۷۸۴۱۵۱۱ نفر، تعداد موارد تب و بثورات مورد انتظار سالانه ۱۵۵۷ مورد، تعداد موارد تب و بثورات گزارش شده ۳۷۹۳ مورد، تعداد موارد تب و بثورات با نمونه‌ی سرم تهیه شده ۳۶۴۹ مورد، تعداد کل سرخک تایید شده ۹۹ مورد، شاخص موارد سرخک تایید شده ۱/۲۷ و درصد نمونه‌گیری ۹۶/۲ بوده است.

با در نظر گرفتن موارد انتظار، گزارش ۲ مورد مشکوک به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت در کشور، نشان می‌دهد بیش از دو برابر مورد انتظار، موارد مشکوک گزارش شده است. در ۹۶/۲ درصد موارد نیز نمونه‌ی سرم تهیه شده است که بالاتر از استاندارد کشوری (تهیه‌ی نمونه از حداقل ۸۰ درصد موارد) می‌باشد. به ازای هر ۱۰۰۰۰۰۰ نفر جمعیت کشور طی سال ۱۳۹۳، تعداد ۱/۲۷ مورد بیمار تأیید شده‌ی مبتلا به سرخک گزارش شده است، که تعدادی از این موارد ابتلا در جمعیت افغانی مهاجر، به ویژه در کارگران افغانی که به صورت غیر قانونی به کشور وارد شده‌اند مشاهده می‌شود.

تحلیل یافته‌های نظام مراقبت بیماری‌ها نشان دهنده‌ی موفقیت چشمگیر نظام سلامت کشور در

دستیابی به هدف حذف بیماری سرخک است، اما باید توجه شود که سطح پایین پوشش برنامه‌های ایمن‌سازی در کشورهای همسایه‌ی شرقی و تردد بالای اتباع این کشورها به کشور ایران، از چالش‌های اصلی برنامه‌ی حذف سرخک در کشور محسوب می‌شود.

تجمع تدریجی افراد حساس به بیماری در اثر عدم واکسیناسیون مناسب و یا شکست پاسخ به ایمن‌سازی، می‌تواند زمینه‌ساز ایجاد طغیان‌های بیماری سرخک شود (۵). در کشور ایران، در بهمن و اسفند ماه سال ۱۳۹۳ در تعدادی از استان‌های کشور، طغیان بیماری سرخک در بین کارگران افغانی که وضعیت پوشش واکسیناسیون در آن‌ها پایین بود، مشاهده گردید. البته طغیان بیماری سرخک در سال‌های اخیر، پدیده‌ی دور از انتظاری نمی‌باشد و در کشورهای دیگر جهان نیز مشاهده شده است؛ به گونه‌ای که در سال‌های ۲۰۰۷-۰۸ میلادی، در کشورهای قطر، عربستان، کویت و عمان (۶-۷) و در دسامبر ۲۰۱۴ تا فوریه‌ی ۲۰۱۵ در ایالت کالیفرنیا در کشور آمریکا مشاهده شده است (۸).

بنابراین، باید به بیماریابی و واکسیناسیون و همچنین، کنترل ورود و خروج اتباع خارجی به ویژه اتباع کشورهای با وضعیت نامناسب پوشش ایمن‌سازی، توجه بیشتری معطوف گردد و این برنامه‌ها در رأس برنامه‌های سیاست‌گذاران بهداشتی در زمینه‌ی بیماری سرخک و بیماری‌های مشابه قرار گیرد.

**ارجاع:** خزایی سلمان، صالحی‌نیا حمید، پاکزاد رضا، محمدیان هفشجانی عبدالله. وضعیت نظام مراقبت بیماری سرخک در کشور ایران در

سال ۱۳۹۳. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۹): ۱۴۸۷-۱۴۹۰

## References

1. World Health Organization. Measles [Online]. [cited 2005 Sep 21]; Available from: URL: <http://www.who.int/topics/measles/en/>.
2. Zahraei M, Dadras MN, Sabori A. National guideline for measles surveillance (elimination phase). 2<sup>nd</sup> ed. Tehran, Iran: Andishmand Publications; 2010. [In Persian].
3. Gouya MM, Tabatabaei SM, Zahraei SM, Ahmadnia H, Ghotbi M. Principle of disease prevention and surveillance. Tehran, Iran: Control Disease Center; 2007. [In Persian].
4. World Health Organization. Report of the Regional Consultation on Measles [Online]. [cited 2009 Aug 25-27]; Available from: URL: [www.who.int/immunization/sage/SEARO\\_Report\\_consultation\\_measles.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/SEARO_Report_consultation_measles.pdf).
5. Takahashi S, Metcalf JE, Ferrari MJ, Moss WJ, Truelove SA, Tatem AJ. Reduced vaccination and the risk of measles and other childhood infections post-Ebola. *Science* 2015; 347(6227): 1240-2.
6. Progress towards reducing measles mortality and eliminating measles, WHO Eastern Mediterranean Region, 1997-2007. *Wkly Epidemiol Rec* 2008; 83(11): 97-104.
7. World Health Organization. The work of WHO in the Eastern Mediterranean Region: Annual report of the Regional Director [Online]. [cited 2007]; Available from: URL: <http://www.emro.who.int/about-who/annual-reports/>
8. Zipprich J, Winter K, Hacker J, Xia D, Watt J, Harriman K. Measles outbreak- California, December 2014-February 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 64(6): 153-4.



## The Status of Iran Measles Surveillance System in 2014

Salman Khazaei MSc<sup>1</sup>, Hamid Salehiniya MSc<sup>2</sup>, Reza Pakzad MSc<sup>3</sup>,  
Abdollah Mohammadian-Hafshejani MSc<sup>4</sup>

### Letter to Editor

#### Abstract

The results showed success of the health system to detect suspected cases of the measles and appropriate sampling from suspected cases that were more than expected. In addition, per every one million population of Iran in 2014, 1.27 of cases of measles were reported; that a numbers of confirmed cases observed in Afghan refugees. Low levels of immunization coverage in eastern neighboring countries and high immigration to Iran, are the main challenge of measles elimination in Iran. The gradual accumulation of susceptible individuals, due to lack of proper vaccination or failure to respond to immunization, may underlie the development of outbreaks of measles in Iran.

**Keywords:** Measles, Surveillance system, Iran

**Citation:** Khazaei S, Salehiniya H, Pakzad R, Mohammadian-Hafshejani A. **The Status of Iran Measles Surveillance System in 2014.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1487-90

1- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran  
2- Researcher, Minimally Invasive Surgery Research Center, Iran University of Medical Sciences AND PhD Student, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
3- PhD Student, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
4- Epidemiologist, Department of Social Medicine, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan AND PhD Candidate, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
**Corresponding Author:** Abdollah Mohammadian-Hafshejani MSc, Email: amohamadii1361@gmail.com

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](mailto: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, 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. **Saeid 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 Razmjou** 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. 33, No. 349, 1<sup>st</sup> Week, November 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](mailto:publications@mui.ac.ir)

### Office:

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

Telefax: +98 31 37922291

E-mail: [jims@med.mui.ac.ir](mailto: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 31 36686302

E-mail: [esfahanfarzanegan@yahoo.com](mailto:esfahanfarzanegan@yahoo.com)

[f.radandish@gmail.com](mailto:f.radandish@gmail.com)

[www.farzaneganco.ir](http://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](http://www.sid.ir))
- [www.iranmedex.com](http://www.iranmedex.com)

---

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

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