



مقاله های پژوهشی

- ۷۲۴ بررسی ویروس Epstein-Barr در کارسینوم پستان در جمعیتی از زنان ایرانی
 مژگان مختاری، فائزه سادات ناجی، محمدامین نجفی، منابه بحرینی اصفهانی
- ۷۳۰ تکثیر و توالی یابی بخشی از ژن مسؤؤل تشکیل خط سفید دفاعی در *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از Degenerate Polymerase Chain Reaction
 محیاسادات لاجوردی، اعظم قطبی، فاطمه موسوی، حسن رکنی زاده
- ۷۳۷ تهیهی داربست نانوالیاف فیبرین/ پلی وینیل الکل به روش الکتروریسی جهت کاربرد در مهندسی بافت
 علی والیانی، علی صدقی، بتول هاشمی بنی، محمد رفیعی نیا
- ۷۴۵ بررسی نتایج پیش گویی معیار Alvarado تغییر یافته در تشخیص موارد آپاندیسیت حاد
 مجتبی جواهر زاده، بابک ثابت، ناصر ملک پور علمداری، بهرنگ کاظمی نژاد، نوید نورایی، مجتبی مخبر دزفولی

گزارش مورد

- ۷۵۱ گزارش یک مورد درمان موفقیت آمیز Thrombotic Thrombocytopenic Purpura در حاملگی
 ملیحه امیریان، فائزه جعفریان، الهام امینی

Original Articles

- Epstein-Barr Virus in Breast Carcinoma: A Study on an Iranian Population 729
 Mojgan Mokhtari, Faegheh Sadat Naji, Mohammad Amin Najafi, Mona Bahreini-Isfahani
- Partial Amplification and Sequencing of Gene Involved in Formation of Defensive White Line Reaction in *Pseudomonas aeruginosa* Using Degenerate Polymerase Chain Reaction 736
 Mahya Sadat Lajevardi, Azam Ghotbi, Fatemeh Mousavi, Hassan Rokni-Zadeh
- Preparation of Fibrin/Poly Vinyl Alcohol Electrospun Nanofibers Scaffold for Tissue Engineering Applications 744
 Ali Valiani, Ali Samadi, Batoool Hashemibeni, Mohammad Rafienia
- The Predictive Value of Modified Alvarado Score in Diagnosis of Acute Appendicitis 750
 Mojtaba Javaherzadeh, Babak Sabet, Naser Malekpour-Alamdari, Behrang Kazeminejad, Navid Noraei, Mojtaba Mokhber-Dezfolyi
- Case Report
- Successful Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Pregnancy: A Case Report 755
 Maliheh Amiriam, Faezeh Jafarian, Elham Amini



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و چهارم، شماره (۳۸۸)، هفتمه چهارم مردادماه ۱۳۹۵

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 مریم راد احمدی

ناشر:	امور نشر:
انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان	(ویراستاری، صفحه‌آرایی، بازبینی، طراحی، چاپ و پشتیبانی آنلاین)
نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان	
Email: publications@mui.ac.ir	
دفتر مجله: دانشکده پزشکی	صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶
مدیر اجرایی: علی مرادی	مسئول دفتر: گلناز رجبی
تلفن: ۰۳۱-۳۶۶۹۴۷۳۷	دورنگار: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۲۹۱
Email: jims@med.mui.ac.ir	دورنگار: ۰۳۱-۳۲۲۲۴۳۸۲
وب سایت مجله: http://www.journals.mui.ac.ir/jims	تیراژ: ۵۰۰ نسخه

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

- | | |
|---|--|
| ■ Scopus | ■ Google Scholar |
| ■ Chemical Abstracts | ■ Index Copernicus |
| ■ Islamic World Science Citation Center (ISC) | ■ Directory of Open Access Journal (DOAJ) |
| ■ Academic Search Complete EBSCO Publishing databases | ■ Index Academicus |
| ■ WHO/EMRO/Index Medicus | ■ 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 محمد رضا اخلاقی	دانشیار، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دکتر علی اخوان	استادیار، متخصص رادیوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دکتر ابراهیم اسفندیاری	استاد، دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دکتر فرامرز اسماعیل بیگی	استاد، فوق تخصص غدد، دانشکده‌ی پزشکی، کالیفرنیا، آمریکا
۵- دکتر احمد اسماعیل زاده	استاد، دکترای تخصصی تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶- دکتر افسون امامی	دانشیار، فوق تخصص نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۷- دکتر شاهین امامی	گروه بیوشیمی، بیمارستان سن آنتونیو، پاریس، فرانسه
۸- دکتر بابک امرا	استاد، فوق تخصص ریه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۹- دکتر رضا امین	استاد، متخصص بیماری‌های کودکان، فوق تخصص بیماری‌های ایمونولوژی و آلرژی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۱۰- دکتر فریبا ایرجی	استاد، متخصص بیماری‌های پوست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۱- دکتر کن باست	استاد، متخصص بیماری‌های پوست، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۱۲- دکتر رضا باقریان سرارودی	دانشیار، دکترای تخصصی روانشناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۳- دکتر مجید برکتین	استاد، متخصص روانپزشکی، فلوشیپ نوروسایکیاتری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۴- دکتر فرزین پور فرزاد	دکترای تخصصی زیست‌شناسی سلولی و ژنتیک، دانشگاه اراسموس، روتردام، هلند
۱۵- دکتر مسعود پورمقدس	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۶- دکتر احمد چیت‌ساز	استاد، متخصص مغز و اعصاب، فلوشیپ بیماری‌های حرکتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۷- دکتر علی حکمت‌نیا	استاد، متخصص رادیولوژی، فلوشیپ رادیولوژی مغز و اعصاب و کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۸- دکتر سید مرتضی حیدری	استاد، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۹- دکتر مجید خیراللهی	دانشیار، دکترای تخصصی ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۰- دکتر بهناز خانی	دانشیار، متخصص زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۱- دکتر مریم راداحمدی	استادیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۲- دکتر حسن رزمجو	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۳- دکتر رضا روزبهانی	استادیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۴- دکتر مسعود سهیلیان	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲۵- دکتر محمدرضا شریفی	استاد، دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۶- دکتر منصور شعله‌ور	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۷- دکتر رسول صالحی	استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۸- دکتر مسیح صبوری	استاد، متخصص جراحی مغز و اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۹- دکتر محمدرضا صفوی	دانشیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۰- دکتر خسرو عادل	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۳۱- دکتر سعید عندلیب جرتانی	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لوئیس ویل، آمریکا
۳۲- دکتر زیبا فرج‌زادگان	استاد، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۳- دکتر رویا کلیشادی	استاد، متخصص بیماری‌های کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۴- دکتر جعفر گلشاهی	دانشیار، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۵- دکتر عزیز گهری	استاد، متخصص بیماری‌های پوست، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	استاد، متخصص آسیب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	استاد، دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر آتیه مغیثی	استاد، فوق تخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، آمریکا
۴۰- دکتر مرجان منصوریان	استادیار، دکترای تخصصی اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۱- دکتر محمدرضا نوربخش	استاد، متخصص فیزیوتراپی، جرجیا، آمریکا
۴۲- دکتر مصطفی هاشمی	دانشیار، متخصص گوش و حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

راهنمای نگارش و ارسال مقاله علمی - پژوهشی

مجله علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی اصفهان، در SCOPUS نمایه شده و به صورت ماهنامه، تحت حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتشر می‌گردد. این مجله اقدام به انتشار مقالات علمی در زمینه پژوهش‌های علوم پزشکی (پایه و بالینی) و رشته‌های وابسته به آن می‌نماید. مقالاتی در این مجله پذیرفته می‌شوند که علمی- پژوهشی بوده و پیش از این در جای دیگری منتشر نشده و یا حتی به طور همزمان به مجلات دیگر ارسال نگردیده باشند. این مجله مقالات به زبان فارسی شامل انواع پژوهشی اصیل، مروری، گزارش موردی، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را منتشر می‌نماید و بر روی وب سایت مجله به آدرس <http://jims.mui.ac.ir> قرار می‌دهد. مقالات ارسالی باید در فرمت پیشنهادی مجله ارسال گردند و به دست نوشته‌هایی که در خارج از فرمت ذکر شده در راهنمای نویسندگان ارسال گردند ترتیب اثر داده نخواهد شد.

هیأت تحریریه پس از دریافت مقالات اقدام به بررسی مقاله از لحاظ ساختاری و موضوعی می‌نماید و چنانچه مقاله در بررسی اولیه مورد تأیید باشد، برای داوری ارسال می‌شود. زمان فرایند داوری (از دریافت تا پذیرش نهایی آن) ۳ ماه و در صورت تقاضا جهت بررسی سریع‌تر با شرایط ذکر شده در راهنمای نویسندگان ۲۵-۲۰ روز می‌باشد. لازم به ذکر است داوری و انتشار مقاله در این هفته نامه مستلزم پرداخت هزینه است. لذا پس از انجام مراحل داوری و پذیرش مقاله و قبل از صدور نامه پذیرش، لازم است نویسندگان محترم فرایند مالی را تکمیل نمایند.

نحوه ارسال دست نوشته‌ها در سامانه

نویسندگان محترم پس از آماده سازی دست نوشته مطابق راهنمای نویسندگان، از طریق ثبت نام (Registration) در سامانه الکترونیک مجله دانشکده پزشکی اصفهان به آدرس <http://jims.mui.ac.ir>، می‌توانند وارد صفحه شخصی خود شده و تمامی بخش‌ها را تکمیل و دست نوشته را ارسال نمایند.

توجه به نکات زیر در ارسال مقاله ضروری است:

- ارسال مقاله منحصراً از طریق ثبت نام در سامانه الکترونیک مجله دانشکده پزشکی انجام می‌شود. لازم است فقط نویسنده مسؤول اقدام به سابمیت مقاله نماید و مقالاتی که توسط سایر نویسندگان یا اشخاص دیگر سابمیت شوند مورد بررسی قرار نخواهند گرفت.
- نویسنده‌ای که برای بار دوم اقدام به ارسال مقاله اصلاح شده خود می‌نماید، حتماً باید از طریق صفحه شخصی قبلی خود اقدام نموده و به هیچ عنوان دوباره به عنوان کاربر جدید و با ایمیل جدید در سامانه ثبت نام نکند.
- وارد کردن اسامی تمامی نویسندگان در سامانه و در محل مربوط به وارد کردن اسامی نویسندگان مقاله، الزامی است.
- پس از ارسال مقاله، تغییر اسامی نویسندگان امکان پذیر نمی‌باشد.
- فایل‌هایی که نویسنده در مرحله اولیه ارسال می‌کنند شامل: (۱) فایل Word صفحه عنوان (۲) فایل Word دست نوشته، (۳) فرم تعهدنامه، (۴) فرم مشخصات کامل نویسندگان (Cover letter) است که به ترتیب بایستی آپلود گردند.
- نویسندگان در قسمت ارسال فایل‌ها، با ارسال یک فایل تعهد نامه که به امضای همه نویسندگان رسیده است، حق انتشار مقاله را به مجله دانشکده پزشکی اصفهان واگذار می‌نمایند. در غیر این صورت مقاله در روند داوری قرار نخواهد گرفت.
- مقالات ارسالی باید دارای فایل مجزا (Cover letter) شامل یک نامه خطاب به سردبیر حاوی عنوان مقاله، اسم، آدرس و ایمیل نویسنده مسؤول، اسامی و ایمیل سایر نویسندگان باشد. در این نامه بایستی به صراحت اعلام گردد که دست نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد.
- در مرحله دوم بعد از این که دست نوشته از نظر همراستایی و فرمت مجله مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت و تأییدیه دفتر مجله در خصوص قابل ارجاع بودن آن دست نوشته برای شروع فرایند داوری ارسال گردید، ضروری است ۵۰ درصد کل هزینه به منظور شروع فرآیند داوری به عنوان (Processing fee) بر اساس موارد ذکر شده در بخش هزینه انتشار راهنمای نویسندگان پرداخت گردد. این هزینه غیر قابل برگشت می‌باشد. سپس فایل مربوط به تصویر اسکن شده فیش پرداختی فقط با نام نویسنده مسؤول از طریق سایت به دفتر مجله ارسال گردد. لازم به ذکر است تنظیم دست نوشته بر اساس فرمت مجله، و پرداخت وجه اولیه فقط جهت ارسال به داوران بوده و دال بر پذیرش آن نمی‌باشد.

از مؤلفان گرامی تقاضا می‌شود، در ارسال مقالات به نکات زیر توجه فرمایند:

- ارسال مقاله فقط از طریق سایت پذیرفته می‌شود.

- زبان رسمی مجله، فارسی است و مقالات فقط به زبان فارسی همراه با چکیده انگلیسی قابل پذیرش هستند.

- دست‌نوشته‌های به زبان‌های غیر از فارسی و ترجمه شده در این مجله منتشر نمی‌شود.

- مقالات باید پژوهشی و حاصل تحقیق نویسنده یا نویسندگان در زمینه علوم پزشکی (پایه و بالینی) و رشته‌های مرتبط بوده که پیش از این به انگلیسی یا فارسی در سایر مجلات منتشر نشده باشد و یا به طور همزمان به مجلات دیگر نیز ارسال نگردیده باشد.

- این مجله مقالات شامل انواع اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را در منتشر می‌نماید.

- فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین نیز توسط این مجله انتشار می‌یابد.

• مقالات قابل انتشار در مجله علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی اصفهان شامل موارد زیر می‌باشند.

الف- مقالات پژوهشی اصیل: مقالات علمی- پژوهشی با حداکثر حجم ۲۵۰۰ کلمه؛ سقف مجموع جداول و تصاویر ۴، سقف منابع و مأخذ ۳۰ عدد می‌باشد.

ب- مقالات کوتاه پژوهشی: مقالات علمی کوتاه پژوهشی با حداکثر ۱۰۰۰ کلمه؛ سقف مجموع جداول و تصاویر ۲، سقف منابع و مأخذ ۱۵ عدد می‌باشد.

ج- مقالات مروری - مقالات مروری (Review Article) از نویسندگان مجرب و صاحب مقالات پژوهشی در زمینه مورد بحث پذیرفته خواهد شد. اصول کلی نگارش مشابه سایر مقاله‌های پژوهشی است. این نوع مقالات با حداکثر ۷۰۰۰ کلمه می‌باشند. در فهرست منابع حداقل ۶ مرجع مورد استفاده می‌بایستی متعلق به نویسنده باشد (با حداقل چهار مقاله از شش مقاله به عنوان نویسنده اول و یا نویسنده مسؤول). برای ارسال مقالات مروری ضروری است که حتماً از قبل با سردبیر مجله هماهنگی لازم صورت گرفته و سپس اقدام به ارسال دست‌نوشته نمایند در غیر اینصورت مجله از بررسی آن معذور است.

د- نامه به سردبیر - نامه به سردبیر می‌تواند به صورت ارایه مشاهدات علمی یا نقد یکی از مقالات چاپ شده در این مجله باشد و با بحثی کوتاه، همراه با درج فهرست منابع نگاشته شود. نامه به سردبیر با حداکثر ۱۰۰۰ کلمه؛ سقف مجموع جداول و تصاویر ۲، سقف منابع و مأخذ ۵ عدد می‌باشد. نقد مقاله برای نویسنده مسؤول مقاله مورد نقد، ارسال خواهد شد و همراه با پاسخ وی، در صورت تصویب شورای نویسندگان به چاپ خواهد رسید.

ه- تحقیقات کیفی - تحقیقات کیفی با حداکثر ۳۰۰۰ کلمه؛ سقف مجموع جداول و تصاویر ۴، سقف منابع و مأخذ ۳۰ عدد می‌باشد.

ز- گزارش مورد- گزارش‌های موردی شامل گزارش موارد نادر یا جالب است و باید شامل چکیده، مقدمه، گزارش مورد، بحث، نتیجه‌گیری، سپاس‌گزاری و منابع باشد. گزارش مورد با حداکثر ۱۰۰۰ کلمه؛ سقف مجموع جداول و تصاویر ۵، سقف منابع و مأخذ ۱۵ عدد می‌باشد.

تبصره ۱- مقالات ترجمه پذیرفته نمی‌شود.

تبصره ۲- ارسال دست‌نوشته یا مدارک با فرمت PDF به هیچ عنوان پذیرفته نیست.

تبصره ۳- مقاله‌های کارآزمایی بالینی پیش از ارسال برای انتشار، بایستی در یکی از مراکز ثبت کارآزمایی‌های بالینی مانند مرکز ثبت کارآزمایی بالینی ایران IRCT به آدرس زیر ثبت شده و کد ثبت آنها به همراه مقاله ارسال شود: <http://www.irct.ir>

- مقالات ارسالی باید دارای بخش‌های ذیل باشند و به دست‌نوشته‌هایی که خارج از فرمت ذکر شده ارسال گردند ترتیب اثر داده نخواهد شد.

- دست‌نوشته باید توسط نرم‌افزار MS Word در سایز A4 و فاقد هرگونه صفحه‌آرایی، فاصله خطوط ۱ برابر (Single) با حاشیه‌های ۲/۵ سانتی‌متری، به صورت یک ستونی، قلم B Zar و سایز ۱۱، قلم عنوان B Zar سایز ۱۱ Bold تهیه شوند. برای تایپ متن خلاصه انگلیسی و رفرنس‌ها از قلم Time New Roman سایز ۱۰ و جهت قلم عنوان لاتین نیز از قلم Time New Roman سایز ۱۰ Bold استفاده شود.

- معادلات باید به صورت خوانا با حروف و علائم مناسب با استفاده از Microsoft Word Equation تهیه شوند. واحدها بر حسب واحد بین‌المللی (SI) و معادلات به ترتیب شماره گذاری شوند.

- دست‌نوشته باید شامل دو فایل: (۱) فایل Word صفحه عنوان (۲) فایل Word دست‌نوشته (به ترتیب دارای چکیده، مقدمه، روش‌ها، یافته‌ها، بحث، تقدیر و تشکر و منابع) باشد. تأکید می‌گردد از ارسال فایل‌های متعدد حاوی جداول، تصاویر و غیره خودداری شود.

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 و تقدیر و تشکر (شامل تشکر از افراد، شماره طرح پژوهشی و یا پایان‌نامه، ذکر منابع مالی و اعتباری طرح پژوهشی) باشد. ضروری است که علاوه بر ذکر تقدیر و تشکر در صفحه عنوان، در پایان دست‌نوشته نیز بخش تقدیر و تشکر مجدد تکرار گردد.

- ذکر اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان به انگلیسی نیز در صفحه عنوان الزامی است.

تبصره ۱- عنوان مقاله معرف محتوای مقاله باشد و از ۲۰ واژه تجاوز نکند.

تبصره ۲- با توجه به سیستم الکترونیک مجله، مقاله مستقیماً برای داور ارسال می‌گردد، لذا توجه شود که در فایل ورد پس از صفحه عنوان، مقاله فاقد اسامی نویسندگان باشد. در غیر این صورت تا اصلاح شدن فایل، ارسال مقاله برای داور متوقف می‌شود.

- چکیده: تمام مقالات اصلی باید دارای چکیده مقاله به دو زبان فارسی و انگلیسی با حداکثر ۲۵۰ کلمه باشد. چکیده باید شامل بخش‌های مقدمه، روش‌ها، یافته‌ها، بحث و واژگان کلیدی باشد. در پایان چکیده مقاله سه الی پنج کلمه کلیدی قرار می‌گیرد که بایستی تنها با استفاده از راهنمای MeSH از آدرس (<http://nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) استخراج گردند. چکیده انگلیسی بایستی دقیقاً معادل چکیده فارسی باشد و شامل بخش‌های **Keywords, Conclusion, Findings, Methods, Background** باشد.

- 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.

- روش‌ها: این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط منع 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؛ شیوه تأمین روایی مشخص شود و توصیف دقیق فرآیند اجرایی برای رواسازی آن توضیح داده شود. چگونگی تعیین روش‌های مورد استفاده برای تأمین پایایی پرسش‌نامه و گزارش نتایج آزمون‌های آماری به کار گرفته شده جهت تأمین پایایی توضیح داده شود. در مورد پرسش‌نامه‌های استاندارد ذکر نام و مرجع آن کافی است.

- یافته‌ها: این بخش به صورت متن همراه با جدول‌ها، شکل‌ها و نمودارها ارائه می‌گردد. در این بخش فقط یافته‌ها ارائه می‌شود و باید از ذکر دلایل و استدلال‌های مرتبط با آن خودداری گردد. محتوای جداول نباید به صورت کامل در متن ارائه شوند، بلکه کافی است با ذکر شماره جدول، شکل و یا نمودار به آنها در میان متن اشاره شود. جدول‌ها، نمودارها و شکل‌ها هر کدام باید در یک صفحه جداگانه و پس از منابع، در پایان دست‌نوشته به ترتیب آورده شوند. همچنین باید جداول و نمودارها در فایل اصلی دست‌نوشته، علاوه بر ارجاع در متن، محل قرارگیری آنها نیز جانمایی شده باشند.

- 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.

- جدول‌ها: جداول بدون حاشیه خارجی ارسال گردد. 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 دست‌نوشته (پس از منابع) قرار داده شوند. جدول‌ها باید دارای زمینه سفید و بدون سایه و ترام باشد. جداول باید توسط نرم‌افزار MS Word و فاقد هرگونه صفحه آرایی، فاصله خطوط ۱ برابر (Single)، قلم B Zar و سایز ۱۰ و قلم متغیرهای هر ستون B Zar و سایز ۱۰ Bold تهیه شوند. برای تایپ کلمات لاتین در جدول از قلم Time New Roman سایز ۹ استفاده شود.

- تصویر و نمودار: تصویر یا نمودار همراه ذکر عنوان آن در زیر و با فرمت JPG قابل قبول است. لازم است هر تصویر با کیفیت ۲۰۰ نقطه در اینچ و محدودیت حجم حداکثر ۵۰۰ کیلو بایت در نظر گرفته شود.

تبصره ۱- اگر شکل یا جدولی از مرجع دیگری اخذ شده است، شماره مرجع در آخر عنوان جدول یا شکل نوشته شود و مشخصات مأخذ در بخش مراجع درج شود. -تقدیر و تشکر: در این بخش تمام افرادی که به نحوی در انجام مطالعه نقش داشته ولی جزء نویسندگان نبوده‌اند 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. همچنین ذکر نام سازمان(های) حمایت‌کننده یا تأمین‌کننده مالی پژوهش در این بخش ضروری است.

- در صورتی که دست‌نوشته حاصل از پایان‌نامه دانشجویی باشد حتماً بایستی در قسمت تقدیر و تشکر شماره پایان‌نامه مصوب دانشگاه و نیز نام دانشگاه ذکر گردد.

- تبصره ۱- ضروری است که علاوه بر ذکر تقدیر و تشکر در صفحه عنوان، در پایان دست‌نوشته نیز بخش تقدیر و تشکر مجدد تکرار گردد.

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

-اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

نمونه انگلیسی:

Inser N. Treatment of calcific aortic stenosis. Am J Cordial 1987; 59(6): 314-7

نمونه فارسی:

Zini F, Basiri Jahromi Sh. Study of fungal infections in patients with leukemia. Iran J Public Health 1994; 23(1-4): 89-103. [In Persian].

(نام نویسندگان با علامت کاما از هم جدا شود. ذکر اسامی نویسندگان تا نفر ششم الزامی است. اگر تعداد نویسندگان بیش از شش نفر باشد، پس از نام نفر ششم، از عبارت "et al." استفاده شود.)

- اگر منبع مورد نظر کتاب است:

نام خانوادگی (فاصله) حرف اول نام کوچک نویسنده (.) عنوان کتاب (.) نوبت چاپ (.) محل نشر (:) ناشر (؛) سال انتشار (.) P (.) شماره صفحات (.) مثال:

نمونه انگلیسی:

Romenes GJ. Cunningham's manual. 15th ed. New York, NY: Oxford Univ Press; 1987.

نمونه فارسی:

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

- اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

نام خانوادگی (فاصله) حرف اول نام کوچک نویسنده آن فصل. عنوان فصل مورد نظر. در: نام خانوادگی (فاصله) حرف اول نام کوچک تدوین کننده ی کتاب. عنوان کتاب. نوبت چاپ. محل نشر: نام ناشر؛ سال انتشار. P. صفحات. مثال:

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

- منابع به صورت پایان نامه

نام خانوادگی نویسنده (فاصله) حرف اول نام کوچک نویسنده (.) عنوان پایان نامه (فاصله) [مقطع پایان نامه] (.) نام شهر، کشور (:) نام دانشکده (.) نام دانشگاه (؛) سال انتشار

- منابع به صورت الکترونیکی - مجله الکترونیکی روی اینترنت

نام خانوادگی (فاصله) حرف اول نام کوچک نویسنده (.) عنوان مقاله (.) نام اختتامی مجله الکترونیکی (فاصله) [online] (سال نشر (و ماه نشر در صورت لزوم) (؛) دوره (شماره) (:) [شماره صفحات یا قابها] (.) [روز، ماه و سال دسترسی] [cited] (؛) Available from (:) آدرس اینترنتی دسترسی مثال:

Mosharraf R, Hajian F. Occlusal morphology of the mandibular first and second premolars in Iranian adolescents. Inter J Dental Anthropol [Online] 2004; 5: [3 Screens] [cited 2006 Nov 13]; Available from: <http://www.jida.syllabapress.com/abstractsijda5.shtml>

منابع به صورت صفحه وب

نام خانوادگی (فاصله) حرف اول نام کوچک نویسنده [یا شرح پدیدآور] (.) عنوان (.) سال نشر در صورت دسترسی (:) [شماره صفحات یا قابها] [روز، ماه و سال دسترسی] [cited] (؛) Available from (:) آدرس اینترنتی دسترسی مثال:

Dentsply Co. BioPure (MTAD) Cleanser. [2 screens] [cited 2006 Nov 26]. Available from: www.store.tulsadental.com/catalog/biopure.html

- نمونه خوانی (Proofreading): یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده مسؤول ارسال می گردد که لازم است در کوتاه ترین زمان تغییرات مورد نظر مجله انجام داده، از طریق وبسایت مجله ارسال نماید.

- اختصارات و نشانه ها: تنها از اختصارات و نشانه های استاندارد استفاده شود و از ذکر عبارات های مخفف در عنوان و خلاصه مقاله خودداری گردد.

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

- پس از انتشار، نسخه ای برای نویسنده مسؤول ارسال نخواهد شد و شماره های مجله از طریق سایت برای نویسندگان و خوانندگان قابل دسترسی می باشد.

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

۷۲۴.....بررسی ویروس Epstein-Barr در کارسینوم پستان در جمعیتی از زنان ایرانی
مژگان مختاری، فائقه‌سادات ناجی، محمدمامین نجفی، منا بحرینی

تکنیر و توالی‌یابی بخشی از ژن مسؤل تشکیل خط سفید دفاعی در *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از
۷۳۰.....**Degenerate Polymerase Chain Reaction**
محیاسادات لاجوردی، اعظم قطبی، فاطمه موسوی، حسن رکنی‌زاده

۷۳۷.....تهیه‌ی داربست نانوالیاف فیبرین/پلی وینیل الکل به روش الکتروریسی جهت کاربرد در مهندسی بافت
علی والیانی، علی صمدی، بتول هاشمی بنی، محمد رفیعی‌نیا

۷۴۵.....بررسی نتایج پیش‌گویی معیار **Alvarado** تغییر یافته در تشخیص موارد آپاندیسیت حاد
مجتبی جواهر زاده، بابک ثابت، ناصر ملک‌پور علمداری، بهرنگ کاظمی‌نژاد، نوید نورایی، مجتبی مخبر دزفولی

گزارش مورد

۷۵۱.....گزارش یک مورد درمان موفقیت‌آمیز **Thrombotic Thrombocytopenic Purpura** در حاملگی
ملیحه امیریان، فائزه جعفریان، الهام امینی

بررسی ویروس Epstein-Barr در کارسینوم پستان در جمعیتی از زنان ایرانی

مژگان مختاری^۱، فائقه‌سادات ناجی^۱، محمدمین نجفی^۲، منا بحرینی اصفهانی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کارسینوم پستان، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان به شمار می‌رود که در میان انواع آن، کارسینوم داکتال مهاجم پستان، شایع‌ترین نوع کارسینوم پستان می‌باشد. ویروس Epstein-Barr، مظنون اصلی در ارتباط با اتیولوژی ویروسی این سرطان است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان آنتی‌ژن هسته‌ای ویروس Epstein-Barr (EBNA-1 یا Epstein-Barr nuclear antigen-1) در کارسینوم داکتال مهاجم پستان بود.

روش‌ها: در این مطالعه، ۴۰ زن ایرانی مبتلا به کارسینوم داکتال مهاجم پستان وارد مطالعه شدند. بیان آنتی‌ژن هسته‌ای ویروس Epstein-Barr در تومور به روش Polymerase chain reaction (PCR) ارزیابی شد. خصوصیات بیماران و ویژگی‌های تومور از جمله اندازه، درجه و درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری، جمع‌آوری و بین بیماران با و بدون بیان آنتی‌ژن هسته‌ای ویروس مقایسه شدند.

یافته‌ها: متوسط سن بیماران ۴۸/۷ سال بود. آنتی‌ژن Epstein-Barr در ۱۱ بیمار (۲۷/۵ درصد) مثبت و در ۲۹ بیمار منفی بود. متوسط اندازه‌ی تومور ۴/۴۳ سانتی‌متر بود. در ۲۲ بیمار، درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری وجود داشت. ۵ بیمار تومور درجه‌ی ۱، ۱۹ بیمار تومور درجه‌ی ۲ و ۱۶ بیمار، تومور درجه‌ی ۳ داشتند. تومور در بیماران EBNA مثبت در مقایسه با بیماران EBNA منفی اندازه‌ی بزرگ‌تری داشت و اختلاف مشاهده شده معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۴۹$). EBNA-1 به جز اندازه، با هیچ یک از دیگر متغیرهای مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به مشاهده‌ی مواردی از مثبت شدن EBNA-1 در این مطالعه، ویروس Epstein-Barr ممکن است نقشی در کارسینوم پستان داشته باشد.

واژگان کلیدی: کارسینوم داکتال پستان، Epstein-Barr virus، Epstein-Barr nuclear antigen، Polymerase chain reaction.

ارجاع: مختاری مژگان، ناجی فائقه‌سادات، نجفی محمدمین، بحرینی اصفهانی منا. بررسی ویروس Epstein-Barr در کارسینوم پستان در جمعیتی

از زنان ایرانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۸): ۷۲۹-۷۲۴

مقدمه

توجیه می‌شود. این عوامل، شامل ژنتیک، سبک زندگی و عوامل موجود در گردش خون مانند هورمون‌های جنسی و هورمون رشد هستند (۴-۵). از این رو، پژوهشگران بر آن شدند تا در جستجوی علل دیگر کارسینوم پستان برآیند (۴-۶). عوامل ویروسی، به عنوان عامل احتمالی در ایجاد کارسینوم پستان مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷-۸). کشف ویروس تومور پستان موش (MMTV یا Mouse mammary tumor virus) فرضیه‌ی علل ویروسی را در ایجاد کارسینوم پستان در حیوانات تأیید می‌کند (۶).

ویروس Epstein-Barr (EBV یا Epstein-Barr virus) نوعی هرپس ویروس است که تخمین زده می‌شود نزدیک به ۹۰ درصد جمعیت عادی به آن آلوده هستند. این ویروس، از مظنونان اصلی

تخمین زده می‌شود که سالانه ۱/۴ میلیون مورد جدید کارسینوم پستان شناخته شود که این تعداد، ۲۳ درصد از تمامی سرطان‌ها را در بر می‌گیرد. سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان شناخته شده در زنان در میان جمعیت‌ها می‌باشد (۱-۳). مطالعات اپیدمیولوژیک در جوامع ایرانی، بروز و شیوع کارسینوم پستان را ۲۲ و ۱۲۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر نشان می‌دهد. در این مطالعات، شایع‌ترین نوع کارسینوم پستان، کارسینوم داکتال مهاجم (۷۷ درصد) گزارش شده است و کمترین شیوع، متعلق به کارسینوم لبولر مهاجم (۵ درصد) می‌باشد (۱). پژوهشگران به طور گسترده‌ای به بررسی آن دسته از علل ایجاد سرطان پرداخته‌اند که تنها نیمی از موارد کارسینوم پستان توسط آن

۱- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

Email: fsn_med87@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: فائقه‌سادات ناجی

EB3 و 5'-AAGGAGGGTGGTTTGGAAAG
EB4 5'-AGACAATGGACTCCCTTAGC
Real-time PCR با استفاده از روش Taq-Man PCR و دستگاه (Applied biosystems) مورد سنجش قرار گرفت.

به طور خلاصه این که ۲۵۰ نانوگرم از DNA حاصل از استخراج نمونه‌ی بافت تومور به مخلوط PCR شامل ۱۰ میلی‌مول ۵۰ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)، ۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۱۰ میلی‌مول dATP (Deoxyadenosine triphosphate)، Deoxycytidine triphosphate (dCTP)، Deoxyguanosine triphosphate (dGTP) و Deoxythymidine triphosphate (dTTP) به میزان ۰/۲ میلی‌مول از هر پرایمر، ۰/۱ میلی‌مول TaqMan fluorogenic probe و ۱/۲۵ واحد از آنزیم AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)، اضافه گردید. به دنبال فعال‌سازی آنزیم AmpliTaq Gold برای ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۵-۵۰ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای انجام PCR در نظر گرفته شد.

جهت واکاوی داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آماری Mann-Whitney Independent t، χ^2 و ANOVA استفاده شد. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۴۰ زن مبتلا به کارسینوم داکتال مهاجم پستان مورد ارزیابی قرار گرفتند. متوسط سن بیماران، ۴۸/۷ سال (با محدوده‌ی ۲۶-۶۶ سال و انحراف معیار ۱۰/۴۱) بود. استاندارد این مطالعه برای مثبت بودن EBV، کشف آنتی‌ژن EBNA-1 به روش PCR بود. ارزیابی EBNA-1 در ۱۱ بیمار (۲۷/۵ درصد) مثبت و در ۲۹ بیمار (۷۲/۵ درصد) منفی بود. میانگین اندازه‌ی تومور ۴/۴۳ سانتی‌متر (با محدوده‌ی ۱۰-۰/۵ و انحراف معیار ۲/۵۱) بود. درگیری غدد لنفاوی زیر بغل در ۲۲ بیمار (۵۵ درصد) مثبت بود. در طبقه‌بندی بافت‌شناسی، ۵ بیمار درجه‌ی ۱ (۱۲/۵ درصد)، ۱۹ بیمار درجه‌ی ۲ (۴۷/۵ درصد) و ۱۶ بیمار درجه‌ی ۳ (۴۰/۰ درصد) بودند (جدول ۱).

خصوصیات بیماران و ویژگی‌های تومور از جمله اندازه، درجه و درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری جمع‌آوری و بین بیمارانی که آنتی‌ژن هسته‌ای ویروس در آن‌ها بیان شده و بیمارانی که این آنتی‌ژن در آن‌ها بیان نشده بود، مقایسه شدند.

ویروس مؤثر در ایجاد کارسینوم پستان به شمار می‌رود. EBV اکنون از علل شناخته شده‌ی لنفوم بورکیت، لنفوم هوچکین، زیر گروهی از کارسینوم معده و کارسینوم نازوفارنکس می‌باشد (۹-۱۱). کشف ارتباط میان کارسینوم پستان و ویروس Epstein-Barr، نه تنها برای پیشرفت دانش ما در خصوص علل ایجاد کننده‌ی کارسینوم پستان سودمند است، بلکه می‌تواند پژوهشگران را در پیش‌گیری، تشخیص زودرس و درمان این تومور یاری رساند.

برای تشخیص حضور EBV در کارسینوم پستان، دو نشانگر اصلی شامل مواد تولید شده در ویروس مانند EBER (Epstein-Barr virus encoded small RNAs) و EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1) وجود دارد. EBNA-1 پروتئینی هسته‌ای است که برای عملکرد مناسب ژنوم ویروس اهمیت دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان EBNA1 در کارسینوم داکتال مهاجم پستان در جمعیتی از زنان مبتلا به این تومور در اصفهان بود.

روش‌ها

از اردیبهشت ۱۳۹۳ تا مرداد ۱۳۹۴، ۴۰ زن ایرانی مبتلا به کارسینوم داکتال مهاجم شناسایی و وارد مطالعه شدند. در همه‌ی این بیماران، کارسینوم پستان به تازگی تشخیص داده شده بود و هیچ کدام سابقه‌ی قبلی کارسینوم پستان و بدخیمی دیگر نداشتند. بیماران آلوده به عفونت‌های ویروسی هم‌زمان از مطالعه خارج شدند. استانداردهای ویژه برای مثبت بودن EBV در کارسینوم پستان، یافتن آنتی‌ژن EBNA-1 با روش Polymerase chain reaction (PCR) بود.

ویژگی‌های بیماران از جمله ویژگی‌های تومور که شامل اندازه، درجه و درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری بود، جمع‌آوری گردید. درجه‌ی تومورها بر اساس طبقه‌بندی Scarff Bloom and Richardson تعیین شد (۱۲). وضعیت غدد لنفاوی با روش بافت‌شناسی ارزیابی شد. کمیته‌ی اخلاق پزشکی، مطالعه بر روی نمونه‌های بانک نمونه‌ها را تأیید نمود. DNA بافت تومور، از بلوک پارافینی بافت تثبیت شده در فرمالین کارسینوم داکتال مهاجم با استفاده از کیت High pure viral nucleic acid kit (Qiagene, Europe) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و در فریزر در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره گردید.

برای بررسی EBNA، DNA استخراج شده به همراه دیگر مواد موجود در Master mix و پرایمر/پروب ناحیه‌ی ژنی EBNA که برابر با ۲۹۵ bp و ۲۰۹ bp بوده و توالی‌های آن، EB1 5'-ATCGTGGTCAAGGAGGTTCC، EB2 5'-ACTCAATGGTGTAAAGACGAC

جدول ۱. بررسی ارتباط بین بیان EBNA-1 در کارسینوم پستان با برخی از عوامل بالینی و آسیب‌شناسی

متغیر	EBNA(+) (n = ۱۱ / ۲۷/۵ درصد)	EBNA(-) (n = ۲۹ / ۷۲/۵ درصد)	مقدار P
سن	۴۸/۳ ± ۱۴/۶	۴۸/۹ ± ۸/۶	۰/۸۷۰
اندازه‌ی تومور	۵/۵ ± ۲/۶	۴/۰ ± ۲/۴	۰/۰۴۹
درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری	۶ (۷۲/۷)	۱۶ (۲۷/۳)	۰/۱۱۶
درجه	I	(۱۰۰)	۰/۷۹۰
	II	۸ (۴۲/۱)	
	III	۳ (۱۸/۸)	

EBNA: Epstein-Barr nuclear antigen

(۲۲-۲۰). به عنوان مثال، Herrmann و Niedobitek نقش ویروس EBV در پاتوژنز کارسینوم پستان را رد کردند. در مطالعه‌ای آنان انجام دادند، ۵۹ نمونه‌ی بیوپسی از کارسینوم پستان از نظر EBNA-1 و EBER مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها مشاهده کردند که در هیچ بیماری EBNA مثبت نبود. از این رو، پیشنهاد کردند که ویروس EBV نقش چندان مهمی در بروز کارسینوم پستان ندارد (۱۸). بنا بر این، با توجه به تحقیقات اخیر، شواهد متقنی مبنی بر نقش قطعی EBV در بروز کارسینوم پستان وجود ندارد و یافته‌های حاصل متناقض هستند.

در این مطالعه، برخی تفاوت‌های بالینی و آسیب‌شناسی بین دو گروه کارسینوم داکتال مهاجم پستان با و بدون بیان EBNA-1 بررسی گردید. تومورهای EBNA-1 مثبت در مقایسه با تومورهای EBNA-1 منفی بزرگ‌تر بودند و تفاوت بین این دو گروه، از نظر آماری معنی‌دار بود. سن، درجه و درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری در میان بیماران این دو گروه، تفاوت قابل توجهی از نظر آماری نداشت. نتایج مربوط به ارتباط بین درجه‌ی تومور و مثبت بودن EBNA-1، در مطالعات قبلی همخوان نبوده است. به عنوان مثال، در تشابه با این مطالعه، Zekri و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی ۹۰ نفر خانم از دو ملیت متفاوت با نژاد عرب (مصری و عراقی) انجام دادند، ارتباط قابل توجهی بین حضور EBV و درجه‌ی تومور نیافتند (۲۳). این یافته‌ها، در تضاد با مطالعات قبلی است که توسط Bonnet و همکاران (۲۴)، Murray و همکاران (۲۵) و Mazouni و همکاران (۲۶) انجام شده است. این ۳ مطالعه، به ارتباط قابل توجه آماری بین EBV و درجه‌ی تومور اشاره دارند و بیان می‌کنند که مثبت بودن EBV به طور قابل توجهی با افزایش درجه‌ی تومور همراه است.

از نظر ارتباط بین اندازه‌ی تومور و مثبت بودن EBV، مطالعات قبلی نتایج متفاوتی ذکر کرده‌اند. نتایج مطالعه‌ی حاضر، در همخوانی با نتایج مطالعه‌ی Murray و همکاران (۲۵) است، اما از طرف دیگر، در تضاد با برخی مطالعات قبلی مانند مطالعه‌ی Mazouni و همکاران

تومورهایی که EBNA-1 در آن‌ها مثبت بود، نسبت به تومورهای EBNA-1 منفی بزرگ‌تر بودند و این تفاوت بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود (۲/۶ ± ۵/۵) در بیماران EBNA مثبت و (۴/۰ ± ۲/۴) در بیماران EBNA منفی، (P = ۰/۰۴۹) (جدول ۱). سن، درجه و درگیری غدد لنفاوی آگزیلاری در میان بیماران این دو گروه، تفاوت قابل توجهی از نظر آماری نداشت (جدول ۱).

بحث

هدف از انجام این مطالعه، بررسی ارتباط ویروس Epstein-Barr با کارسینوم پستان و نیز ارتباط آن با برخی از ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناسی این تومور بود. انجمن IARC (International Agency for Research on Cancer) که انجمنی بین‌المللی به منظور تحقیقات بر روی سرطان است، ویروس Epstein-Barr را در دسته‌ی اول از ویروس‌هایی قرار می‌دهد که در پیدایش کارسینوم نقش دارند.

در این مطالعه، مشاهده گردید که شیوع بیان ژن EBNA-1 در کارسینوم مهاجم داکتال پستان ۲۷/۵ درصد است. مطالعات قبلی، با استفاده از روش PCR درصد‌های متفاوتی در مورد این شیوع بیان کرده‌اند که این درصدها بین ۵۰-۱۰ درصد متغیر است (۱۸-۱۳، ۹)، برای مثال، Lorenzetti و همکاران ۷۱ بیوپسی از کارسینوم پستان را از نظر حضور EBV بررسی و مشاهده کردند که ۳۱ درصد (۲۲ نفر از ۷۱ نفر) از بیماران دارای EBV بودند (۱۹).

در مطالعه‌ی دیگری، Grinstein و همکاران، ۲۴ بیمار را با روش MGB-TaqMan real time PCR (MGB) از نظر حضور ویروس EBV در خون محیطی و همچنین، نمونه‌ی تومور بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که ۱۱ بیمار (۴۶ درصد)، دارای نتیجه‌ی آزمایش مثبت برای EBV DNA بودند (۱۷). از طرف دیگر، در بعضی مطالعات، حضور ویروس EBV در این سرطان رد شده است

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دکتری عمومی پزشکی حرفه‌ای متعلق به فائده‌سادات ناجی است که در حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره‌ی ۳۹۴۵۷۸ تصویب گردید و با حمایت‌های این معاونت به انجام رسید. نویسندگان مقاله، از زحمات این معاونت سپاسگزاری می‌نمایند.

(۲۶) و Bonnet و همکاران (۲۴) است که ارتباط معنی‌داری بین EBV و اندازه‌ی تومور نیافتند. با توجه به نتایج متنوع مطالعات انجام شده در این زمینه، نیاز به انجام مطالعات بیشتر به منظور مشخص کردن نقش EBV در اتیولوژی و پیشرفت کارسینوم پستان وجود دارد. به عنوان نتیجه‌گیری نهایی، یافته‌های حاصل از این مطالعه، به نقش احتمالی EBV در پاتوژنز کارسینوم پستان اشاره دارد.

References

- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
- El Saghir NS, Khalil MK, Eid T, El Kinge AR, Charafeddine M, Geara F, et al. Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing Arab countries: a literature and registry analysis. *Int J Surg* 2007; 5(4): 225-33.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(14): 1126-35.
- Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38(1): 103-13.
- Serraino D, Piselli P, Scognamiglio P. Viral infections and cancer: epidemiological aspects. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15(3): 224-8.
- Antonsson A, Bialasiewicz S, Rockett RJ, Jacob K, Bennett IC, Sloots TP. Exploring the prevalence of ten polyomaviruses and two herpes viruses in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(8): e39842.
- Glenn WK, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker NJ, Lawson JS. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(11): e48788.
- Fina F, Romain S, Ouafik L, Palmari J, Ben AF, Benharkat S, et al. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br J Cancer* 2001; 84(6): 783-90.
- Fukayama M, Hino R, Uozaki H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99(9): 1726-33.
- Hippocrate A, Oussaief L, Joab I. Possible role of EBV in breast cancer and other unusually EBV-associated cancers. *Cancer Lett* 2011; 305(2): 144-9.
- Le D, V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtatos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989; 64(9): 1914-21.
- Xue SA, Lampert IA, Haldane JS, Bridger JE, Griffin BE. Epstein-Barr virus gene expression in human breast cancer: protagonist or passenger? *Br J Cancer* 2003; 89(1): 113-9.
- Mohamed WS, Mohamed MA, Omar MM. Possible involvement of Epstein-barr virus (EBV) in pathogenesis and prognosis of female breast infiltrating duct carcinoma: clinicopathological, immunohistochemical and molecular study. *Egy J Med Microbiol* 2007; 16(2): 403-14.
- Fawzy S, Sallam M, Awad NM. Detection of Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Egyptian women. *Clin Biochem* 2008; 41(7-8): 486-92.
- Brink AA, van Den Brule AJ, van Diest P, Meijer CJ. Re: detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(8): 655-6.
- Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, de Matteo E, et al. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res* 2002; 62(17): 4876-8.
- Herrmann K, Niedobitek G. Lack of evidence for an association of Epstein-Barr virus infection with breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 2003; 5(1): R13-R17.
- Lorenzetti MA, de Matteo E, Gass H, Martinez VP, Lara J, Gonzalez P, et al. Characterization of Epstein Barr virus latency pattern in Argentine breast carcinoma. *PLoS One* 2010; 5(10): e13603.
- Glaser SL, Ambinder RF, DiGiuseppe JA, Horn-Ross PL, Hsu JL. Absence of Epstein-Barr virus EBER-1 transcripts in an epidemiologically diverse group of breast cancers. *Int J Cancer* 1998; 75(4): 555-8.
- Dadmanesh F, Peterse JL, Sapino A, Fonelli A, Eusebi V. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the breast: lack of evidence of Epstein-Barr virus infection. *Histopathology* 2001; 38(1): 54-61.
- Kijima Y, Hokita S, Takao S, Baba M, Natsugoe S, Yoshinaka H, et al. Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *J Med Virol* 2001; 64(4): 513-8.
- Zekri AR, Bahnassy AA, Mohamed WS, El-Kassem FA, El-Khalidi SJ, Hafez MM, et al. Epstein-Barr virus and breast cancer: epidemiological and molecular study on Egyptian and Iraqi women. *J Egypt Natl Canc Inst* 2012; 24(3): 123-31.
- Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(16): 1376-81.

25. Murray PG, Lissauer D, Junying J, Davies G, Moore S, Bell A, et al. Reactivity with A monoclonal antibody to Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 defines a subset of aggressive breast cancers in the absence of the EBV genome. *Cancer Res* 2003; 63(9): 2338-43.
26. Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Brandone JM, et al. Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(2): 332-7.

Epstein-Barr Virus in Breast Carcinoma: A Study on an Iranian Population

Mojgan Mokhtari¹, Faegheh Sadat Naji², Mohammad Amin Najafi², Mona Bahreini-Isfahani²

Original Article

Abstract

Background: Invasive ductal carcinoma (IDC) is the most frequent type of breast carcinoma. Epstein-Barr virus is the most suspicious virus for the viral etiology of breast cancer. The aim of this study was to determine the expression of EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1) in IDC.

Methods: 40 Iranian women with invasive ductal carcinoma of breast were enrolled in this study. Tumors were assessed for the expression of EBNA1 antigen by PCR technique. Demographics of patients as well as characteristics of tumors including size, grade, and axillary lymph node status were collected and compared between EBNA1 positive and EBNA1 negative tumors.

Findings: The mean age of patients was 48.7 year. EBNA-1 PCR assay was positive in 11 patients (27.5%). The mean diameter of tumors was 4.43 cm. Axillary lymph nodes were involved in 22 patients. Tumors were grade I, II, and III in 5, 19, and 16 patients, respectively. EBNA-1 positive tumors were significantly larger than EBNA-1 negative tumors (5.5 ± 2.6 vs. 4.0 ± 2.4 ; $P = 0.049$).

Conclusion: According to the results of this study, EBV might have a role in the pathogenesis of breast cancer.

Keywords: Invasive ductal carcinoma, Breast, Epstein-Barr virus (EBV), Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA-1), Polymerase chain reaction (PCR)

Citation: Mokhtari M, Naji FS, Najafi MA, Bahreini M. **Epstein-Barr Virus in Breast Carcinoma: A Study on an Iranian Population.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(388): 724-9.

1- Professor, Department of Pathology, 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: Faegheh Sadat Naji, Email: fsn_med87@yahoo.com

تکثیر و توالی‌یابی بخشی از ژن مسؤوّل تشکیل خط سفید دفاعی در *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از Degenerate Polymerase Chain Reaction

محیاسادات لاجوردی^۱، اعظم قطبی^۱، فاطمه موسوی^۱، حسن رکنی‌زاده^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لیوپپتیدهای *Pseudomonas* مانند White line-inducing principle (WLIP)، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی حایز اهمیتی می‌باشند. زمانی که باکتری مولد WLIP در مجاورت با *Pseudomonas tolaasii* کشت داده شود، خط سفید رنگی در بین آن‌ها ایجاد خواهد شد. با شناسایی راهبرد White line reaction (WLR) و بررسی تنوعات آن در انواع مختلف *Pseudomonas* شاید بتوان از آن به عنوان رویکردی برای درمان بیماری‌های عفونی استفاده کرد. در این مطالعه، با استفاده از تکنیک Degenerated polymerase chain reaction (Degenerate PCR) سعی گردید تا برای اولین بار به طور جزئی سیستم ژنتیک WLR در *Pseudomonas aeruginosa* شناسایی شود.

روش‌ها: آنالیز دمین آنزیم‌های Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) با استفاده از ابزار Non-ribosomal peptide synthetase-Polyketide synthases (NRPS-PKS) انجام شد. همچنین، با به کارگیری برنامه‌ی Geneious الاینمنت چندگانه‌ی توالی DNA، آنالیزهای فیلوژنتیک و بلاست لوکال انجام گردید. در نهایت، DNA ژنومی *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1272 استخراج و Degenerate PCR انجام شد.

یافته‌ها: در ابتدا تکثیر (PCR) بر اساس دمین‌های C1 و TE انجام شد. با وجود تکرارها و تغییرات متعدد، علاوه بر باند مورد نظر، باندهای دیگری نیز به دست آمد. بدین منظور، با استفاده از ژن wlp/wip بلاست بر علیه ژنوم‌های *Pseudomonas aeruginosa* انجام شد. دو رکورد در دو سویه‌ی *Pseudomonas aeruginosa* در حدود ۵۰ درصد Identity با ژن wlpB سویه‌ی RW10S2 مشاهده شد. بعد از الاینمنت این دو رکورد با wlpB در RW10S2، طراحی پرایمر و تکثیر انجام شد. با انجام Blastp تنها یک پروتئین به نام Gramicidin D در باکتری *Ralstonia solanacearum* SD54 با میزان Identity حدود ۴۳ درصد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تشکیل خط سفید دفاعی توسط سویه‌ی *Pseudomonas aeruginosa* به احتمال زیاد توسط یک سیستم ژنتیک متفاوت از آنچه که تاکنون گزارش شده است، انجام می‌شود.

واژگان کلیدی: لیوپپتید White line-inducing principle، خط سفید دفاعی، انواع *Pseudomonas*

ارجاع: لاجوردی محیاسادات، قطبی اعظم، موسوی فاطمه، رکنی‌زاده حسن. تکثیر و توالی‌یابی بخشی از ژن مسؤوّل تشکیل خط سفید دفاعی در *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از Degenerate Polymerase Chain Reaction. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۸): ۷۳۶-۷۳۰

مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات، متشکل از یک دم اسید چرب و الیگوپپتید کوتاه حلقوی یا خطی می‌باشند (۳-۴).
لیوپپتیدها توسط سیستم‌های آنزیمی خاصی به نام Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) و مستقل از ریبوزوم‌ها سنتز می‌شوند (۵). یکی از مهم‌ترین این نوع ترکیبات، White line-inducing principle (WLIP) می‌باشد که با تشکیل

مقدمه

یکی از راه‌حل‌های مبارزه با مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک، شناسایی ترکیبات ضد باکتری جدید می‌باشد (۱). باکتری‌های *Pseudomonas* که در اطراف ریشه‌ی گیاهان زندگی می‌کنند، منبع بسیار غنی برای شناسایی مواد ضد میکروبی جدید از قبیل لیوپپتیدها می‌باشند (۲). لیوپپتیدها، به دلیل خصوصیات ضد میکروبی و ضد توموری، بسیار

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و نانوفن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و نانوفن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

Email: hassan.roknizadeh@zums.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤوّل: حسن رکنی‌زاده

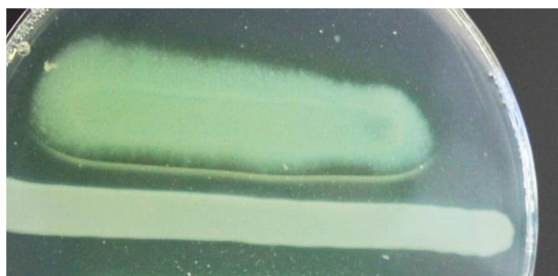
پایگاه داده با استفاده از blastx و blastn و از طریق ژنهای WLR سیستم‌های شناخته شده (wip و wlp .orf) استخراج شدند. سپس، با استفاده از Pfam، دمن‌های موجود در ژن‌ها شناسایی شدند. در ابتدا، با استفاده از نتایج Pfam و نیز ابزار پیش‌بینی NRPS دمن‌های TE و C1 شناسایی شد و توالی این دمن‌ها استخراج گردید. با استفاده از الاینمنت چندگانه، توالی‌های این نقاط هم‌ردیف شدند و مورد مقایسه قرار گرفتند. نقاط حفاظت شده برای انتخاب مناسب‌ترین نواحی جهت تکثیر و طراحی پرایمرهای Degenerate مورد استفاده قرار گرفت.

Degenerate PCR: DNA ژنومی با استفاده از کیت سیناژن استخراج و کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد. به منظور تعیین دمای Annealing مطلوب برای پرایمرها، PCR گرایان انجام شد. محصولات با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده با ژل رد و Ladder (۳-۱۰۰ bp) مورد بررسی قرار گرفت. باندها مورد نظر، با استفاده از کیت Accu Prep PCR purification kit خالص‌سازی و برای توالی‌یابی ارسال شد.

واکاوای مقایسه‌ای In silico بر روی توالی ژنی به دست آمده انجام شد. با استفاده از Neighbor joining، درخت فیلوژنتیک جهت بررسی قرابت و موقعیت این ژن‌ها با سایر سیستم‌های سنتز لیپوپپتید شناخته شده، با استفاده از نرم‌افزار Geneious (6.0.6) ترسیم گردید.

یافته‌ها

هدف از انجام این مطالعه، شناسایی بخشی از ژن‌های NRPS مربوط به WLR در *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد. به منظور تأیید قابلیت این باکتری در تولید خط سفید دفاعی، آزمایش WLR انجام شد و همان گونه که شکل ۱ نشان می‌دهد، تولید خط سفید توسط این سویه مشاهده گردید.



شکل ۱. خط سفید دفاعی به دست آمده از تعامل *Pseudomonas aeruginosa* با *Pseudomonas tolaasii* LMG1274 سویه‌ی CH36 در محیط (TSA) Trypticase soya agar

پدیده‌ای جالب به نام خط سفید دفاعی در مقابل باکتری پاتوژن، می‌تواند باکتری هدف را بدون از بین بردن آن مهار نماید (۶).

سیستم ژنتیک سنتز کننده‌ی WLIP، برای اولین بار در باکتری *Pseudomonas putida* RW10S2 و سپس در باکتری *Pseudomonas fluorescens* LMG 5329 توسط رکنی‌زاده و همکاران (۷) و Ghequire و همکاران (۸) شناسایی و گزارش شد. این سیستم ژنتیک در *Pseudomonas putida* شامل سه ژن سنتزی NRPS (به نام‌های wlpA، wlpB و wlpC)، سه ژن سنتز کننده‌ی پروتئین غشایی با عملکرد خروج لیپوپپتید و یک تنظیم کننده از خانواده‌ی luxR برای تنظیم تولید لیپوپپتید می‌باشد. همچنین، در *Pseudomonas fluorescens* سه ژن NRPS (wlpA، wlpB و wlpC)، یک سیستم ترشحی و یک تنظیم کننده از نوع luxR در تولید WLIP نقش دارد، اما در سطح توالی این دو سیستم ژنتیک با یکدیگر دارای تفاوت قابل توجهی می‌باشند (۹). ماهیت ژن‌های NRPS مادول مانند است و هر مادول، یک اسیدآمینوی خاص را به زنجیره‌ی پپتیدی در حال ساخت اضافه می‌کند (۲).

نتایج سایر مطالعات اولیه نشان داده است که در گونه‌های متفاوت یعنی *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1272 White line reaction (WLR) نیز اتفاق می‌افتد (۱۰). توانایی این گونه، که یک باکتری مهم پاتوژن انسانی است، در تشکیل WLR به ویژه با در نظر گرفتن این که تاکنون هیچ گونه اطلاعاتی در مورد سیستم ژنتیک آن گزارش نشده است؛ بسیار قابل توجه و شناسایی آن بسیار حایز اهمیت است. با شناسایی ژنتیک دقیق راهبرد دفاعی WLR و بررسی تنوع‌های آن در انواع مختلف *Pseudomonas*، شاید بتوان به نحوی به کارگیری احتمالی چنین رویکردی برای درمان بیماری‌های عفونی و یا به عنوان روشی مکمل روش‌های موجود نزدیک‌تر شد. در این مطالعه، با استفاده از تکنیک Degenerate polymerase chain reaction (Degenerate PCR) سعی گردید تا نقاطی از ژن‌های NRPS این سویه، تکثیر و توالی‌یابی شود.

روش‌ها

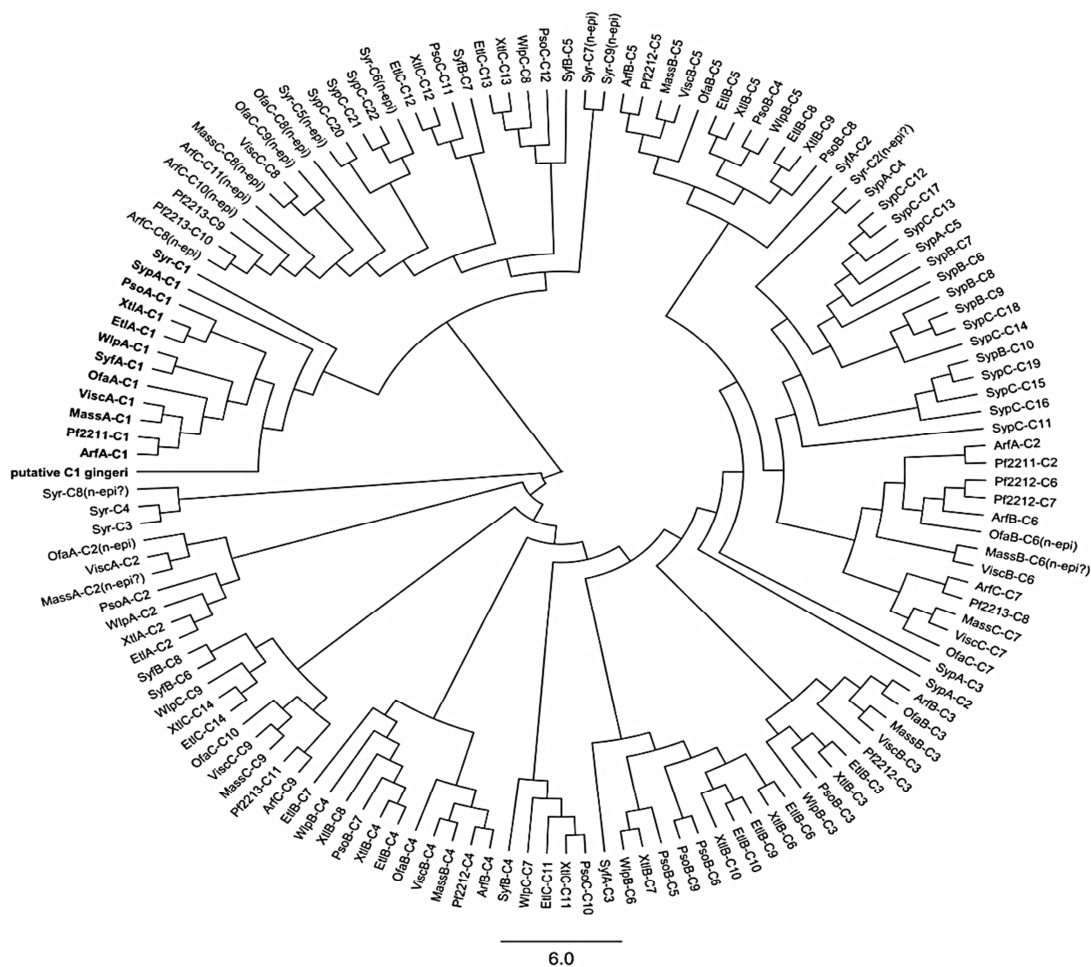
آزمایش تشکیل خط سفید (WLR): این آزمایش، در دو محیط کشت مختلف (TSA) Trypticase soya agar و King's B (KB) و با استفاده از کشت باکتری *Pseudomonas* مولد تولاسین (*Pseudomonas tolaasii*) در کنار *Pseudomonas aeruginosa* به فاصله‌ی حدود ۱ سانتی‌متر در دو دمای ۲۵ و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

طراحی پرایمر: کلیه‌ی توالی‌های NRPS دخیل در WLR در

دو دمین TE (TE1 و TE2) می‌باشند که در NRPS از نوع سیدروفور وجود ندارند. از این رو، این دمین‌ها می‌توانند در کنار دمین C1 هدف مناسبی برای تکثیر NRPS لیپوپتیدی باشند. بنا بر این، در مطالعه‌ی حاضر، ابتدا این دمین‌ها به عنوان هدف اولیه جهت طراحی پرایمر در نظر گرفته شدند. بر روی توالی دمین‌های C1 و TE، سویه‌های *Pseudomonas protegens* Pf-5، *Pseudomonas fluorescens* LMG، *Pseudomonas CMR12a*، *Pseudomonas putida* 5329 و *Pseudomonas gingeri* RW10S2 (همگی مولد WLR می‌باشند) الاینمنت چندگانه انجام شد و توالی‌های پیش‌گفته، برای یافتن نواحی حفاظت شده، مورد مقایسه قرار گرفت و سپس پرایمرهای HRZ1: AITCKCCGITSTAYAMYATCGG
HRZ2: CCCAGCCRTCAGGATCAGGTG
HRZ11: CGCMTGRYCGACCAGGGCAAGGC و HRZ12: ACCAGCCRCRAASGARTGSCC طراحی شد.

جهت بررسی سیستم تولید خط سفید در این سویه ابتدا بر اساس مطالعات پیشین همین گروه دمین‌های C1 و TE به عنوان مناسب‌ترین دمین‌ها انتخاب شد (۱۱). زیرا ژن‌های NRPS علاوه بر لیپوپتیدها، مسؤول سنتز تعدادی از متابولیت‌های غیر لیپوپتیدی نظیر ترکیبات سیدروفور می‌باشند و لازم به ذکر است که همه‌ی باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* از قابلیت تولید ترکیبات سیدروفور برخوردار هستند. با توجه به این که به تازگی لیپوپتیدهای جدید و متعددی شناسایی و در پایگاه داده به ثبت رسیده‌اند، آنالیز مقایسه‌ای دمین‌های C و TE دوباره انجام شد.

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص شده است، از بین تمامی دمین‌های C لیپوپتیدهای مختلف، تنها دمین C1 لیپوپتیدها در یک خوشه قرار گرفته‌اند که این امر، نشان دهنده‌ی تفاوت این دمین از سایر دمین‌های C می‌باشد. از این رو، در صورت طراحی پرایمر بر اساس این دمین، احتمال اتصال آن به دیگر دمین‌های C پایین خواهد بود. از طرفی، NRPS‌های لیپوپتیدی اغلب در انتهای ژن خود دارای



شکل ۲. آنالیز مقایسه‌ای دمین‌های C از ژن‌های Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) مربوط به *Pseudomonas*

تکثیر، پرایمر طراحی شده تغییر یابد. پرایمرها به شرح
 HRZ13: CGCATCGAGCTGGGCGAGATCG
 HRZ14: CCTTGCGGTGTCGAGCTTGCCGTTG
 HRZ15: CCTTGCGGTGTCGAGCTTGCCATTG بود.

با استفاده از این پرایمرهای جدید PCR در دمای ۶۴/۵ درجه سانتی‌گراد و تعداد ۳۸ چرخه انجام شد که در نتیجه آن، باند مورد نظر (۳۰۰ bp) ملاحظه گردید. قطعه‌ی مورد نظر، خالص‌سازی و سپس توالی‌یابی شد. با استفاده از Blastp تنها یک پروتئین به نام گرامیسیدین D در باکتری *Ralstonia solanacearum* SD54 با میزان Identity حدود ۴۳ درصد به دست آمد. گرامیسیدین، از ترکیبات پپتیدی دارای خاصیت آنتی‌بیوتیک می‌باشد که از باکتری‌های *Bacillus brevis* موجود در خاک به دست می‌آید (۱۲).

بحث

جهت شناسایی جزئی از سیستم ژنتیک *Pseudomonas aeruginosa* از تکنیک Degenerate PCR استفاده شد. کاربرد این تکنیک برای مواقعی می‌باشد که توالی ژن موجود نیست؛ از این رو، طراحی پرایمر Degenerate بر اساس الاینمنت ژن‌های ارتولوگ موجود در پایگاه داده صورت می‌گیرد (۸). به منظور شناسایی ژن‌های NRPS، دو راهبرد وجود دارد: راهبرد اول، طراحی پرایمرهای Degenerate بر اساس توالی‌های اسید آمینه‌ای حفاظت شده‌ی دامین‌های آدنیلاسیون و تیولاسیون NRPS می‌باشد. این راهبرد، بر اساس ترجمه‌ی عقب‌گرد (Back translation) (ترجمه‌ی معکوس از پروتئین به DNA) توالی‌های حفاظت شده می‌باشد. Tapi و همکاران، از این روش در سویه‌های مختلف *Bacillus* بهره بردند. آن‌ها از دو سری پرایمر Degenerate جهت تکثیر موتیف‌های حفاظت شده در کلاسترهای بیوسنتزی NRPS سه خانواده‌ی لیوپپتیدی استفاده کردند. نتایج این بررسی، نه تنها نشان دهنده‌ی حضور ژن‌های مورد انتظار در سویه‌های *Bacillus* بود؛ بلکه ژن‌های دیگری نیز در *Bacillus subtilis*، *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus cereus* شناسایی شدند (۱۳).

در راهبرد دوم، طراحی پرایمرهای Degenerate بر اساس مناطق حفاظت شده‌ای می‌باشد که با هم‌ردیف کردن توالی‌های نوکلئوتیدی دامین‌های آدنیلاسیون ژن‌های NRPS به دست می‌آیند. Rajendran با به کارگیری پرایمرهای طراحی شده بر اساس مناطق حفاظت شده‌ی دامین‌های آدنیلاسیون و تیولاسیون در *Bacillus subtilis* موفق به شناسایی یک لوکوس ژنی جدید در *Pseudomonas fluorescens* شد (۱۴). Ayuso-Sacido و Genilloud، در بیش از ۲۱۰ سویه‌ی مختلف، از اکتینومیست‌ها فراوانی گسترده‌ی توالی‌های ژنی مشابه با Polyketide synthase-I (PKS-I) و

در شروع، به منظور تخمین دمای Annealing مناسب با استفاده از پرایمرهای HRZ1 و HRZ2 گرادینت PCR برای سه دمای ۵۷، ۵۸/۱ و ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. نتایج، نشان دهنده‌ی حضور تعدادی باند غیر اختصاصی علاوه بر باند اصلی بود. از این رو، افزایش پارامتر دما در دستور کار قرار گرفت. طی آزمایش‌های متعدد بعدی PCR در چندین دما (۶۵-۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) انجام شد، اما به همراه باند مورد نظر، حضور باندهای غیر اختصاصی نیز قابل توجه بود.

رویکرد دیگر جهت حذف باندهای غیر اختصاصی، کاهش میزان DNA بود که تغییری در نتایج حاصل نشد. پرایمرهای طراحی شده برای دمین TE (HRZ11 و HRZ12) نیز مورد بررسی قرار گرفتند. با وجود به کارگیری گرادینت PCR، هیچ باندهای ملاحظه نشد. از این رو، راهبرد دیگری به کار برده شد. بدین منظور، با استفاده از ژن wlpA/wipA بلاست بر علیه ژنوم‌های *Aeruginosa* انجام شد. همان‌طور که می‌دانیم به تازگی، طرح ۱۰۰۰ ژنوم *Aeruginosa* در دنیا انجام شده است که در آن، ژنوم حدود ۱۰۰۰ سویه‌ی *Aeruginosa* به طور کامل توالی‌یابی شد.

از این رو، با توجه به تعداد بالای این باکتری انتظار می‌رود ارتولوگ ژن‌های wlp/wip (و یا حتی orf) در این ژنوم‌ها مشاهده شود. بنا بر این، با استفاده از این ژن‌ها بر علیه ژنوم‌های *Aeruginosa* BlastX انجام شد و در لیست نتایج، تنها دو رکورد دارای حدود ۵۰ درصد Identity با ژن wlpB سویه‌ی RW10S2 مشاهده شد. میزان پایین Identity بدان معنا می‌باشد که سیستم ژنتیک مولد خط سفید دفاعی در *Aeruginosa*، بسیار متفاوت از موارد شناخته شده است.

نتایج Degenerate PCR (پرایمرها بر اساس ژن‌های مولد خط سفید دفاعی در سیستم‌های شناخته شده بود) نیز مؤید همین موضوع می‌باشد؛ چرا که قطعه‌ی مورد نظر، به طور اختصاصی تکثیر نیافت. در ادامه، جهت پیدا کردن و تکثیر ژن احتمالی مولد خط سفید دفاعی در *Aeruginosa*، ابتدا این دو رکورد مربوط به ژن‌های NRPS در *Aeruginosa* با wlpB RW10S2 الاین شد و منطقه‌ی مناسب با حداکثر حفاظت شدگی جهت طراحی پرایمر انتخاب گردید. با توجه به میزان حفاظت شدگی بالا، پرایمر Forward اختصاصی طراحی گردید، اما برای پرایمر معکوس در ۴ نقطه تفاوت توالی دیده شد. از آن جایی که میزان GC در ژنوم *Aeruginosa* بسیار بالا (بیش از ۶۷ درصد) می‌باشد، تکثیر قطعه‌ی هدف حتی با پرایمر اختصاصی مشکل خواهد بود و این مسأله، با وجود Degenerate بودن پرایمرها، بسیار حادتر می‌باشد. از این رو، در مورد پرایمر معکوس نیز سعی شد تا حد امکان Degeneracy حذف گردد و در صورت عدم موفقیت در

بنا بر این، با طراحی پرایمر بر اساس این دمین، می‌توان مانع از تکثیر ژن‌های NRPS ترکیبات غیر لیپوپپتیدی مانند پیووردین، دمین‌های A، Peridinin-chlorophyll-protein (PCP) و سایر دمین‌های C گردید که این امر، در تکثیر صحیح ژن‌های NRPS با توجه به ماهیت تکراری آن‌ها بسیار حایز اهمیت است و با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد (۱۱).

پرایمرهای اولیه‌ی مطالعه‌ی حاضر، بر اساس دمین‌های پیش‌گفته طراحی شدند، اما قادر به تکثیر ژن هدف نبودند که این امر، بر وجود یک سیستم بسیار متمایز در این سویه دلالت می‌کند. یکی از دلایل انتخاب سویه‌ی *Aeruginosa* برای این مطالعه از بین سویه‌های جدید مولد خط سفید دفاعی، مفروض بودن وجود یک سیستم بسیار متمایز در این سویه بود.

نتایج اولیه‌ی مطالعه‌ی حاضر نیز همین فرضیه را تأیید می‌نماید. از طرفی، با توجه به این که ژنوم *Aeruginosa* غنی از CG می‌باشد، استفاده از PCR جهت تکثیر قطعات ژنی آن به خصوص در نواحی تکراری مانند ژن‌های NRPS امری چالش برانگیز می‌باشد و این مشکل با Degenerate بودن پرایمرها تشدید می‌شود.

جهت تکثیر قطعه‌ای از NRPS این سویه، راهبرد دیگری یعنی استفاده از ژنوم‌های توالی‌یابی شده‌ی طرح ۱۰۰۰ ژنوم *Aeruginosa* بود (۱۸). آنالیزهای این مطالعه، نشان داد که قطعه‌ی مناسب برای تکثیر این ژن‌ها در این سویه، ارتولوگ ژن *wlpB* می‌باشد. با طراحی پرایمر و PCR قطعه‌ی مورد نظر تکثیر و توالی‌یابی شد. با انجام Blast، تنها یک پروتئین به نام گرامیسیدین D در باکتری *Ralstonia solanacearum* SD54 مشاهده شد. این امر، نشانگر وجود اطلاعات بسیار ناچیز درباره‌ی این نوع لیپوپپتید سنتز شده توسط *Pseudomonas aeruginosa* و ضرورت بررسی‌ها و مطالعات بیشتر می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تشکیل خط سفید دفاعی توسط این سویه، به احتمال زیاد توسط یک سیستم ژنتیک متفاوت از آن چه که تاکنون گزارش شده است، انجام می‌شود. از این رو، در قدم بعدی توالی‌یابی کل ژنوم این سویه با استفاده از Next generation sequencing ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی تحقیقاتی محیاسادات لاجوردی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی (A-12-835-7)، مصوب دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد.

s-Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) را نشان دادند. همچنین، این گروه با به کارگیری پرایمرهای ویژه‌ی دمین‌های آدنیلایسون قادر به شناسایی ژن‌های NRPS در باکتری‌هایی گردید که پیش از این، تولید کننده‌ی ترکیبات ضد میکروبی محسوب نمی‌شدند (۱۵).

در تأیید این یافته‌ها، همکاران چندین سویه از اکتینومیست‌های دریایی را به عنوان منابع جدید تولید محصولات زیستی مورد بررسی قرار دادند (۱۶). به منظور ارزیابی توان بیوسنتزی سویه‌ها، غربالگری PCR برای ژن‌های سنتز کننده‌ی متابولیت‌های ثانویه انجام گردید. پرایمرهای Degenerate PCR بر اساس دمین‌های آدنیلایسون NRPS طراحی شدند. این مطالعه، برای اولین بار به بررسی فراوانی سیستم‌های بیوسنتزی مسئول تولید ترکیبات زیستی جدید توسط باکتری‌های خانواده‌ی Micrococcaceae پرداخت. در این بررسی، سه ایزوله‌ی مختلف شناسایی شدند که قادر به تولید آنتی‌بیوتیک جدید تحت عنوان Kocurin بودند. نتایج این بررسی نشان دهنده‌ی آن است که محیط‌های دریایی به ویژه اسفنج‌ها، منبع تولید کننده‌ی متابولیت‌های زیستی جدید و دارای کاربرد بیوتکنولوژی می‌باشند.

همچنین، Tambadou و همکاران با به کارگیری Degenerate PCR به بررسی مجموعه‌ای از ۱۰۰ ایزوله‌ی باکتری آبی در معرض جزر و مد پرداختند. در این مطالعه نیز طراحی Degenerate پرایمرها بر اساس توالی‌های حفاظت شده‌ی دمین‌های A انجام شد. سویه‌های باکتری، از نظر وجود ژن‌های NRPS و تولید ترکیبات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت، این محققین موفق به شناسایی توالی‌های NRPS جدید در این باکتری‌ها شدند (۱۷). بنا بر این، Degenerate primer PCR امکان شناسایی ژن‌های جدید را در گروه‌های تولید کننده‌ی ناشناخته فراهم می‌آورد. رکنی‌زاده و همکاران، راهبرد دیگری را برای یافتن ژن‌های مولد لیپوپپتیدهای جدید معرفی نمودند. در این روش، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیک گسترده، پیش‌بینی شد که بهترین دمین برای هدف قرار دادن NRPS‌های لیپوپپتیدی، دمین C1 و TE می‌باشد و با طراحی پرایمرهای Degenerate و بررسی چندین سویه صحت این پیش‌بینی در عمل مورد تأیید قرار گرفت (۱۱).

با توجه به شناسایی لیپوپپتیدهای جدید آنالیزهای بیوانفورماتیک مقایسه‌ای دمین‌های C و TE بار دیگر در این مطالعه انجام شد. آنالیز مقایسه‌ای دمین C در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس شکل ۲، فقط دمین C1 لیپوپپتیدهای مختلف در یک خوشه قرار گرفتند که این امر، نشان دهنده‌ی تمایز این دمین از سایر دمین‌های C می‌باشد.

References

1. Reardon S. WHO warns against 'post-antibiotic' era. Nature [Online]. [cited 2014 Apr 30]; Available from: URL: <http://www.nature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-1.15135>.
2. Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Nat Prod Rep 2009; 26(11): 1408-46.
3. Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiol Rev 2010; 34(6): 1037-62.
4. Li W, Rokni-Zadeh H, de Vleeschouwer M, Ghequire MG, Sinnaeve D, Xie GL, et al. The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. PLoS One 2013; 8(5): e62946.
5. Rottig M, Medema MH, Blin K, Weber T, Rausch C, Kohlbacher O. NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. Nucleic Acids Res 2011; 39(Web Server issue): W362-W367.
6. Wong WC, Preece TF. Identification of *Pseudomonas tolaasi*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. J Appl Bacteriol 1979; 47(3): 401-7.
7. Rokni-Zadeh H, Li W, Sanchez-Rodriguez A, Sinnaeve D, Rozenski J, Martins JC, et al. Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white-line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. Appl Environ Microbiol 2012; 78(14): 4826-34.
8. Ghequire MG, Rokni-Zadeh H, Zarrineh P, de Mot R. Draft genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* LMG 5329, a white line-inducing principle-producing bioindicator for the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. Genome Announc 2013; 1(4): e00383-13.
9. Rokni-Zadeh H, Li W, Yilma E, Sanchez-Rodriguez A, de Mot R. Distinct lipopeptide production systems for WLIP (white line-inducing principle) in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Environ Microbiol Rep 2013; 5(1): 160-9.
10. Munsch P, Alatossava T. The white-line-in-agar test is not specific for the two cultivated mushroom associated pseudomonads, *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas "reactans"*. Microbiol Res 2002; 157(1): 7-11.
11. Rokni-Zadeh H, Mangas-Losada A, de Mot R. PCR detection of novel non-ribosomal peptide synthetase genes in lipopeptide-producing *Pseudomonas*. Microb Ecol 2011; 62(4): 941-7.
12. Andersen OS, Koeppe RE, Roux B. Gramicidin channels. IEEE Trans Nanobioscience 2005; 4(1): 10-20.
13. Tapi A, Chollet-Imbert M, Scherens B, Jacques P. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85(5): 1521-31.
14. Rajendran N. Identification and cloning of a gene locus encoding peptide synthetase of *Pseudomonas fluorescens* by two sets of PCR primers. Z Naturforsch C 1999; 54(1-2): 105-9.
15. Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. Microb Ecol 2005; 49(1): 10-24.
16. Palomo S, Gonzalez I, de la Cruz M, Martin J, Tormo JR, Anderson M, et al. Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. Mar Drugs 2013; 11(4): 1071-86.
17. Tambaou F, Lanneluc I, Sable S, Klein GL, Doghri I, Sopena V, et al. Novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes sequenced from intertidal mudflat bacteria. FEMS Microbiol Lett 2014; 357(2): 123-30.
18. Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Dupont MJ, Laroche J, et al. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. Front Microbiol 2015; 6: 1036.

Partial Amplification and Sequencing of Gene Involved in Formation of Defensive White Line Reaction in *Pseudomonas aeruginosa* Using Degenerate Polymerase Chain Reaction

Mahya Sadat Lajevardi¹, Azam Ghotbi¹, Fatemeh Mousavi¹, Hassan Rokni-Zadeh²

Original Article

Abstract

Background: *Pseudomonas* lipopeptides such as white line-inducing principle (WLIP) have important antimicrobial activities. When a WLIP producer bacterium is grown close to *P. tolaasii*, a white line precipitate will be formed between them. Identification of white line reaction (WLR) defense strategy and its distribution among different pseudomonads might help to use such an approach for the treatment of infectious diseases. In current study, through a degenerate polymerase chain reaction (PCR) method, the partial characterization of genetic system of NRPS-based WLR was attempted in *Pseudomonas aeruginosa* for the first time in the world.

Methods: Domain analysis of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) enzymes was performed by the nonribosomal peptide synthetase-Polyketide synthases (NRPS-PKS) tool. Multiple DNA sequence alignments, phylogenetic analyses and local Blast searches were performed by Geneious Pro. The gDNA was extracted from *P. aeruginosa* LMG 1272 and degenerate PCR was carried out.

Findings: First, PCR amplification based on the C1 and TE domains was performed. Despite trying several modifications, a number of bands were obtained in addition to our expected band. For this purpose, the gene *wlp/wip* blast against *Pseudomonas aeruginosa* genomes was performed. Two homologues with about 50% identity to *wlpB* in RW10S2 were obtained. New primers were designed by which the target fragment could be amplified whose Blastp identified only one protein in bacterium *Ralstonia solanacearum* SD54 with the identity of about 43%.

Conclusion: This study shows that the defensive white line formation by *P. aeruginosa* is governed most likely by a genetic system different from what has been reported before.

Keywords: White line-inducing principle (WLIP) Lipopeptide, White line reaction (WLR), *Pseudomonas*

Citation: Lajevardi MS, Ghotbi A, Mousavi F, Rokni-Zadeh H. **Partial Amplification and Sequencing of Gene Involved in Formation of Defensive White Line Reaction in *Pseudomonas aeruginosa* Using Degenerate Polymerase Chain Reaction.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(388): 730-6.

1- MSc Student, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, AND Zanzan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

Corresponding Author: Hassan Rokni-Zadeh, Email: hassan.rokni-zadeh@zums.ac.ir

تهیه‌ی داربست نانوالیاف فیبرین/پلی وینیل الکل به روش الکتروریسی جهت کاربرد در مهندسی بافت

علی والیانی^۱، علی صمدی^۲، بتول هاشمی بنی^۳، محمد رفیعی‌نیا^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه، نانو کامپوزیت‌های پلیمری زیست تخریب پذیر، با دارا بودن خواص مکانیکی و زیست سازگاری مناسب، از اهمیت ویژه‌ای در مهندسی بافت برخوردار هستند. هدف از انجام این مطالعه، ساخت و ارزیابی داربست نانوکامپوزیتی فیبرین/پلی وینیل الکل به روش الکتروریسی و زیستایی سلولی بر روی آن می‌باشد.

روش‌ها: داربست نانو کامپوزیتی فیبرین/پلی وینیل الکل، با مقدار ۲۸/۵ درصد وزنی فیبرین نسبت به پلیمر، با روش الکتروریسی تهیه شد. درصد تخلخل داربست با استفاده از نرم‌افزار Matlab و شکل تخلخل‌ها، پراکندگی آن‌ها و اندازه‌ی نانوالیاف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخص شدند. آزمون جذب آب و اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس انجام شد. همچنین، برای ارزیابی زیستایی سلول بر روی داربست از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین اندازه‌گیری قطر الیاف داربست فیبرین/پلی وینیل الکل الکتروریسی شده، ۵۰۰ نانومتر به دست آمد. متوسط اندازه‌ی تخلخل در نمونه‌ی تهیه شده ۷/۱ میکرومتر و تخلخل ۸۳/۸۱ درصد به دست آمد. همچنین، میانگین زاویه‌ی تماس ۳۱/۷۱ درجه و میانگین جذب آب ۲۴ ساعت، ۶۸/۵ درصد بود. آزمون بررسی زیستایی سلول اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه‌های شاهد نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان از داربست الکتروریسی شده‌ی فیبرین/پلی وینیل الکل در مهندسی بافت غضروف و عصب استفاده کرد.

واژگان کلیدی: نانوالیاف، فیبرین، الکتروریسی، داربست

ارجاع: والیانی علی، صمدی علی، هاشمی بنی بتول، رفیعی‌نیا محمد. تهیه‌ی داربست نانوالیاف فیبرین/پلی وینیل الکل به روش الکتروریسی جهت

کاربرد در مهندسی بافت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۸): ۷۳۷-۷۴۴

ایجاد کند و امکان رشد و نفوذ سلول‌ها و جابه‌جایی گازها و مواد غذایی را فراهم کند. همچنین، توانایی جذب پروتئین‌ها و تجزیه‌ی سریع را بعد از عمل پیوند بافت داشته باشد تا بافت جدید بتواند به سرعت رشد کند (۱-۲).

داربست‌های به کار برده شده در مهندسی بافت، به عنوان زیر مجموعه‌ای از مواد زیستی در دو دسته‌ی طبیعی و مصنوعی قرار دارند. فیبرین، یکی از داربست‌های طبیعی است که مکانیزم منحصر به فرد پلیمریزه شدن آن، این امکان را فراهم می‌کند که زیر ساختی نرم در شرایط فیزیولوژیک شکل بگیرد. با کنترل زمان ژلاتینی شدن آن و همچنین، با ایجاد تنوع در شرایط واکنش بین فیبرینوژن و ترومبین، می‌توان خواص داربست را تغییر داد (۳).

مقدمه

مهندسی بافت (Tissue engineering)، یک رویکرد چند رشته‌ای برای مشکل حیاتی پزشکی نوین و عرضه‌ی بافت و اندام برای پیوند است. در این روش درمانی، سعی بر آن است که با ادغام علم مهندسی مواد و علوم زیستی، بافت یا اندامی کارآمد تولید شود تا بتوان از آن برای جایگزینی بافت‌ها یا اندام‌های آسیب دیده استفاده کرد. چالش‌های زیستی و فنی در مهندسی بافت، در سه بخش سلول، داربست و سیستم بیوراکتور متمرکز شده است. داربست در مهندسی بافت، به عنوان جایگزین محیط خارج سلولی عمل می‌کند و باید زیست سازگار (Biocompatible) و زیست تخریب پذیر (Biodegradable) باشد، ساختاری سه بعدی (3 Dimensional)

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

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

و از آن، برای مهندسی بافت میوکارد استفاده کردند و نتایج رضایت‌بخشی به دست آوردند (۱۴). بر اساس مطالعات Perumcherry و همکاران، نتایج قابل قبولی در الکترورسی فیبرین و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف بر روی آن به دست آمد و پیشنهاد شد خواص مکانیکی داربست فیبرین تقویت شود (۸، ۱۵). در این پژوهش، ساخت و ارزیابی خواص داربست نانو کامپوزیتی فیبرین/ پلی وینیل الکل به روش الکترورسی انجام شد و زیستایی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

تهیه فیبرینوژن

برای تهیه فیبرینوژن، کیسه‌ی کرایو از سازمان انتقال خون ایران تهیه و به آزمایشگاه منتقل و پس از استریل شدن، محتویات آن که شامل فیبرینوژن است، به لوله‌ی فالدون ۵۰ سی سی منتقل شد و جهت استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه ترومبین

برای تهیه ترومبین، کیسه‌ی پلاسمای تازه منجمد شده (Fresh frozen plasma) به آزمایشگاه منتقل و استریل شد. محتویات آن (پلاسمای) به فالدون‌های ۵۰ سی سی منتقل و به ازای هر فالدون، یک ویال ۱۰ سی سی آمپول گلوکونات کلسیم (سینا دارو، ایران) اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس، با شتاب ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی که حاوی ترومبین بود، استخراج و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد جهت استفاده نگهداری شد (۱۶).

تهیه محلول پلی وینیل الکل (PVA)

پودر پلی وینیل الکل (Merck73000w، آلمان) خریداری شد. پودر Polyvinyl alcohol (PVA) در مقادیر متفاوتی از آب آنالار (Milli-Q®) حل شد و غلظت‌های مختلف (۴، ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد) وزنی/وزنی محلول، الکترورسی و یکنواختی شکل الیاف زیر میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) بررسی شد. در نهایت، محلول ۱۲ درصد (وزنی/وزنی) که با حل کردن ۶ گرم پودر پلی وینیل الکل در ۴۴ گرم آب آنالار تهیه شده بود، به عنوان غلظت بهینه‌ی پلی وینیل الکل انتخاب شد و در ساخت داربست کامپوزیتی به کار رفت.

فرایند الکترورسی داربست کامپوزیتی فیبرین/ پلی وینیل الکل

برای استفاده از دستگاه الکترورسی، نازل جدید و یک رابط شیشه‌ای به شکل حرف Y طراحی و ساخته شد. برای جلوگیری از واکنش زود هنگام (قبل از تشکیل نانوالیاف) بین فیبرینوژن و ترومبین، هر کدام از محلول‌ها بدون رقیق‌سازی و به صورت جداگانه و به مقدار

فیبرین، به عنوان یک داربست خوب و تطبیق پذیر برای تعداد زیادی از کاربردهای مهندسی بافت (کاربردهای قلبی- عروقی، کبد، پوست، استخوان و غضروف) استفاده شده است. برهم‌کنش بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی، پاسخ ضد التهابی، ترمیم زخم و رگ‌زایی، از خواص ذاتی فیبرین می‌باشد (۴-۵). فیبرین، همچنین به عنوان یک ماده‌ی پوشاننده‌ی عروق استفاده می‌شود و در عمل رگ‌زایی نقش دارد (۷-۶).

فیبرین، با وجود مزایای پیش‌گفته، دارای معایبی از جمله خواص مکانیکی ضعیف است که آن را برای کاربرد در مهندسی بافت به عنوان یک داربست ایده‌آل محدود می‌کند (۸-۹).

برای بهبود خواص داربست فیبرینی، می‌توان فیبرین را با کمک فرایند الکترورسی (Electro spinning) به صورت نانوالیاف درآورد. مواد در اندازه‌ی نانو، خواص متفاوتی از خود نشان می‌دهند. با تبدیل فیبرین به نانوالیاف فیبرین، تخلخل داربست بیشتر می‌شود و باعث افزایش چسبندگی سلولی و همچنین، تبادل بهتر مواد بین سلول و محیط کشت یا مایع میان بافتی می‌گردد که انتظار می‌رود باعث افزایش زیستایی و تزاید سلول‌ها نسبت به داربست فیبرین شود. همچنین، داربست‌های تهیه شده به روش الکترورسی، بعد از پیوند به صورت پویا (Dynamic) تغییر می‌کنند و به سلول‌ها، امکان ساخت ماتریکس بین سلولی و جابه‌جایی برای ساخته شدن کامل بافت جدید را می‌دهند. الکترورسی، یک روش ساده و انعطاف پذیر برای تولید داربست‌های طبیعی و مصنوعی با قابلیت تغییر در قطر، جهت الیاف و تخلخل داربست می‌باشد که با تغییر در پارامترهای ریسنده‌ی صورت می‌گیرد (۱۰).

امروزه، مزیت استفاده از نانو تکنولوژی در تولید الیاف نانو به واسطه‌ی دارا بودن خواص مهم و ویژه‌ای نظیر تراکم پایین، افزایش سطح به حجم و تخلخل بالا، بر کسی پوشیده نیست. پلی وینیل الکل (PVC یا Polyvinyl alcohol)، یک پلیمر مصنوعی است که از پلی وینیل استات طی فرایند هیدروکسی شدن جزئی یا کامل مشتق شده است. این پلیمر، زیست سازگار، محلول در آب و زیست تخریب پذیر می‌باشد. همچنین، غیر سمی و غیر حساسیت‌زا بودن آن، باعث کاربرد گسترده‌ی آن در مهندسی بافت و فرایند الکترورسی شده است (۹، ۱۱).

در مطالعه‌ی Christman و همکاران، از داربست فیبرینی برای انتقال سلول‌ها به محل ضایعه‌ی قلبی در اثر سکته استفاده شد و نتایج رضایت‌بخشی به دست آمد (۱۲). Humphrey و همکاران، نشان دادند که فیبرین، تمایز سلول‌های تروفوبلاست انسانی را افزایش و آپتوتوز سلولی را کاهش می‌دهد (۱۳). Ravichandran و همکاران، داربست الکترورسی شده‌ی فیبرین/ پلی گلیسرول سبکیت را ساختند

(نسخه‌ی 1.44P) و برای محاسبه‌ی درصد تخلخل داربست، از نرم‌افزار Matlab (نسخه‌ی 7.8.0) استفاده شد و با استفاده از الگوریتم‌های موجود، آنالیز تصاویر انجام شد (۱۸).

بررسی آب‌دوستی داربست و تعیین زاویه‌ی تماس (Water contact angle)

برای انجام آزمون آب‌دوستی، داربست در اندازه‌ی ۱۲ میلی‌متر مربع بریده و روی یک پایه‌ی نگه‌دارنده، قرار داده شد. سپس، با دستگاه اتوماتیک (Pendent drop IFT measurement apparatus-CA-ES10) اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس انجام گرفت و زاویه‌ی بین قطره‌ی آب و سطح تراز در سمت راست و چپ قطره، اندازه‌گیری شد. اگر زاویه‌ی θ بین خط تراز (Base line) و قطره‌ی آب بین ۳۰-۰ درجه باشد، آب‌دوستی سطح نمونه زیاد است. اگر زاویه‌ی θ بین ۹۰-۳۰ درجه باشد، آب‌دوستی نمونه متوسط و اگر زاویه‌ی θ بیشتر از ۹۰ درجه باشد، آب‌دوستی نمونه کم است (۱۰).

بررسی میانگین جذب آب داربست

برای بررسی میانگین جذب آب، داربست‌ها در ابعاد ۱ میلی‌متر مربع بریده شدند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری گردید. سپس، به مدت ۲۴ ساعت داخل آب مقطر قرار داده شدند و پس از طی زمان مناسب، نمونه‌ها به وسیله‌ی کاغذ صافی خشک شدند و مقدار وزن تر آن‌ها با کمک ترازوی چهار رقم اعشار (اند، ژاپن) سنجش و سپس درصد جذب آب با رابطه‌ی ۱ محاسبه گردید. در این رابطه، W معادل وزن تر داربست و W_0 معادل وزن خشک داربست می‌باشد.

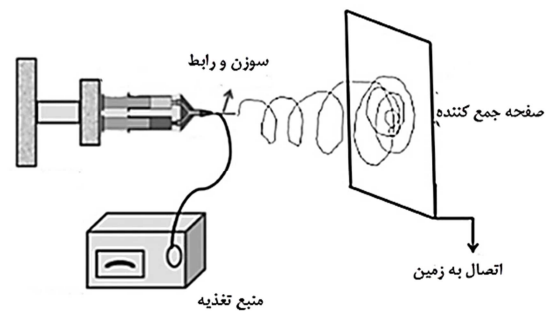
رابطه‌ی ۱) $100 \times (W - W_0 / W_0) =$ میانگین جذب آب نمونه

استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی

بافت چربی زیر جلدی ناحیه‌ی شکم، از ۳ بیمار با رضایت کتبی به دست آمد و بعد از انتقال به آزمایشگاه کشت سلول و تحت شرایط استریل زیر هود کلاس II به قطعات چند میلی‌متری بریده شد. سپس، با محلول فسفات بافر سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich, USA) شستشو و بافت همبندی و عروق خونی آن جدا شد. آن گاه، آنزیم کلاژناز نوع I (Sigma-Aldrich, USA) به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه انکوبه شد. پس از اطمینان از تجزیه‌ی کامل، هم حجم آنزیم محیط کشت (DMEM) Dulbecco's modified eagle's medium (Sigma-Aldrich, USA) جهت خنثی‌سازی آنزیم به آن اضافه شد. سپس، محلول بافتی سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی به دست آمده، با محیط کشت ترکیب شد و به فلاسک‌های T25 منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی

مساوی از هر کدام (۸/۰ سی‌سی) در ۲ سی‌سی محلول پلی‌وینیل الکل (۱۲ درصد) ریخته شد و با همزن مغناطیسی به مدت ۳ ساعت همگن گردید. سپس، در دو سرنگ جداگانه کشیده شد. دو سرنگ با استفاده از رابط Y شکل، مطابق با شکل ۱، به هم متصل شد و یک سوزن با نوک صاف شده (18 Gauge) در انتهای رابط قرار گرفت.

جهت انجام الکتروریسی، فاصله‌ی سوزن تا صفحه‌ی جمع‌کننده، ۲۰-۱۰ سانتی‌متر و ولتاژ ۲۰۰۰-۱۵۰۰ ولت بود. سپس، نمونه‌های تهیه‌شده (نانو وب) جهت انجام شبکه‌کندن (Cross-link) به مدت ۳ ساعت داخل دسیکاتور همراه با ۱۰ سی‌سی از محلول گلوکوتار آلدهید (Merck, آلمان) ۲۵ درصد قرار گرفتند. بلافاصله پس از آن، نمونه‌ها داخل آون خلأ با دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۰ میلی‌بار قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها از آون خارج و در یخچال در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۱. تصویر شماتیک فرایند الکتروریسی. دو سرنگ توسط یک رابط شیشه‌ای مشترک به یک سوزن وصل شده‌اند.

بررسی‌های ریخت‌شناسی و تعیین میانگین اندازه و درصد تخلخل داربست

یکی از بهترین روش‌ها برای مشاهده و مطالعه‌ی مورفولوژی نانوالیاف، بررسی خواص سطحی و اندازه‌گیری قطر الیاف، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM یا Environmental scanning electron microscope) است. حتی با وجود ابداع تکنیک‌های جدید آنالیز تصویر، می‌توان اندازه‌ی تخلخل و درصد تخلخل داربست را با پردازش تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی تعیین نمود (۱۷). برای شناسایی و مشاهده‌ی الیاف الکتروریسی شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل XL30) ساخت شرکت Philips هلند استفاده شد. نمونه‌ها قبل از تهیه‌ی تصویر با لایه‌ی نازکی از طلا پوشش داده شدند. سپس، با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی، میانگین اندازه‌ی قطر نانو الیاف و میانگین اندازه‌ی تخلخل‌ها، از نرم‌افزار Image-j

Hyperion) (ELISA Reader) immunosorbent assay reader (MPR₄) در طول موج ۵۷۰ نانومتر، در روزهای ۳ و ۷ خوانده شد و درصد زیستایی سلولی با رابطه‌ی ۲ محاسبه و نتایج با آزمون One-way ANOVA بررسی شد.

$$\text{Viability (\%)} = \text{OD Treat/OD Control} \times 100 \quad (۲)$$

یافته‌ها

نتایج بررسی ریخت‌شناسی داربست الکتروریسی شده

تصاویر SEM داربست کامپوزیتی در بزرگ‌نمایی‌های مختلف و در حالت‌های قبل و بعد از شبکه‌ای کردن (Cross-link) در شکل ۲ نشان داده شده است.

میانگین قطر الیاف الکتروریسی شده، ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. متوسط اندازه‌ی تخلخل در نمونه‌ی تهیه شده برابر با ۷/۱ میکرومتر به دست آمد. درصد تخلخل که با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر Matlab در بررسی از تصویر به دست آمد، برابر با ۸۳/۸۱ درصد بود. تمام اندازه‌گیری‌ها با ۳ بار تکرار انجام گرفت.

آب‌دوستی داربست با اندازه‌گیری زاویه‌ی تماس قطره‌ی آب با سطح نمونه، مشخص شد. دستگاه Pendent drop IFT measurement apparatus-CA-ES10 در این آزمایش به طور خودکار در هر ثانیه یک تصویر از قطره می‌گرفت و در هر عکس، میانگین زاویه‌ی مورد نظر را در سمت چپ و راست تصویر محاسبه می‌کرد که میانگین آن برابر با ۳۱/۷۱ درجه شد. میانگین جذب آب ۲۴ ساعته‌ی داربست، ۶۸/۵ درصد به دست آمد.

زیستایی سلولی

بعد از استخراج سلول‌های بنیادی (شکل ۳) و در روزهای سوم و هفتم پس از انتقال سلول‌ها روی داربست و استفاده از محلول MTT، میزان زیستایی و تکثیر سلول‌های بنیادی در گروه فیبرین نسبت به گروه شاهد، کاهش نشان داد که این کاهش، در روزهای سوم و هفتم معنی‌دار بود. در گروه فیبرین الکتروریسی شده، افزایش کمی در تعداد سلول‌ها و زیستایی آن مشاهده شد که این افزایش، از لحاظ آماری نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. در روزهای سوم و هفتم، گروه داربست فیبرین الکتروریسی شده نسبت به گروه فیبرین، افزایش در میزان زیستایی سلولی نشان داد که این افزایش، به لحاظ آماری در روز سوم معنی‌دار بود و در روز هفتم معنی‌دار نبود ($P \leq 0.05$) (شکل ۴).

بحث

بزرگ‌ترین چالش موجود در مهندسی بافت، استفاده از داربست مناسب است. خواص داربست مورد استفاده در مهندسی بافت، باید

کشت داده شد. برای تخلیه‌ی سلول‌های مرده و اضافی، محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت تعویض شد و پس از آن، هر سه روز یک بار این کار انجام شد و سلول‌های پاساژ دوم برای بررسی زیستایی سلولی روی داربست‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت سلول بر روی داربست‌ها

(۱) داربست لخته‌ی فیبرینی

برای کشت سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر ترومبین در یک چاهک (پلیت ۲۴ خانه) ریخته شد. سپس، ۱۰^۴ سلول به آن اضافه شد و جهت همگن‌سازی سلول درون داربست، عمل پیپتینگ انجام گرفت و پس از آن، ۳۰۰ میکرولیتر فیبرینوزن به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه جهت تشکیل لخته، پلیت بی‌حرکت گذاشته شد. سپس، ۱/۵ سی‌سی محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد Fetal bovine serum (FBS) (Gibco) و ۱ درصد Penicillin/Streptomycin (Gibco) به آن اضافه شد. پلیت به داخل انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل شد و آزمون‌های بررسی زیستایی و تکثیر سلولی در روزهای سوم و هفتم انجام شدند.

(۲) داربست نانو کامپوزیت فیبرین/پلی وینیل الکل

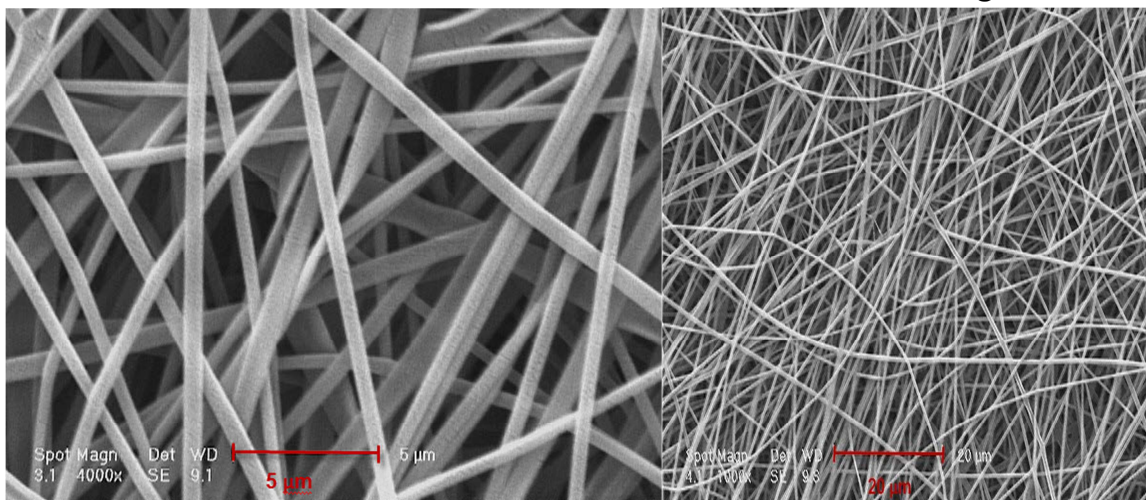
ابتدا داربست‌ها به وسیله‌ی اتانول (Merck) ۷۰ درصد و لامپ فرابنفش به مدت ۳ ساعت استریل و به داخل چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه منتقل شدند. سلول‌ها ترپسیسین شدند و بعد از شمارش، تعداد ۱۰^۴ سلول روی داربست منتقل شد و ۱/۵ سی‌سی محیط کشت به آن اضافه گردید. پلیت به داخل انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ و رطوبت نسبی منتقل شد و آزمون‌های بررسی زیستایی سلولی در روزهای سوم و هفتم انجام شدند.

بررسی زیستایی سلولی

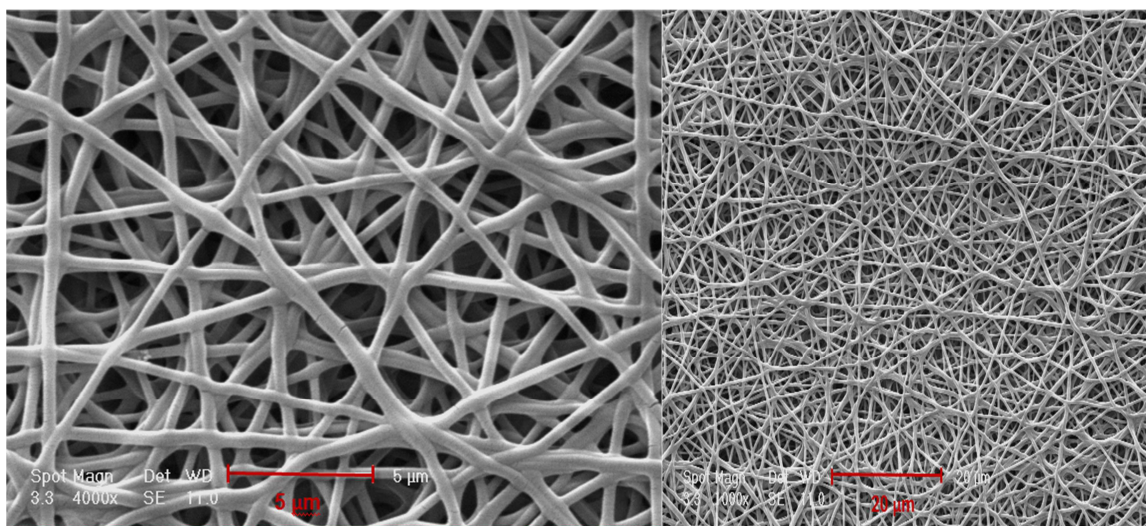
برای بررسی زیستایی سلولی، از آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Merck، آلمان) استفاده شد. ابتدا محیط کشت هر چاهک تخلیه و با ۱/۵ میکرولیتر PBS به ازای هر چاهک، دو مرتبه شستشو انجام شد. سپس، به هر چاهک ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت خالص و ۴۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، محیط رویی تخلیه و ۴۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد (DMSO با حل کردن کریستال‌های فورامازان، رنگ بنفش تولید می‌کند). در انتها، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هر چاهک را به پلیت ۹۶ خانه منتقل و میزان جذب نوری (Optical density یا OD) آن‌ها با دستگاه Enzyme-linked

بافت شباهت زیادی داشته باشد.

با خواص ماتریکس خارج سلولی بافت مورد نظر جهت مهندسی

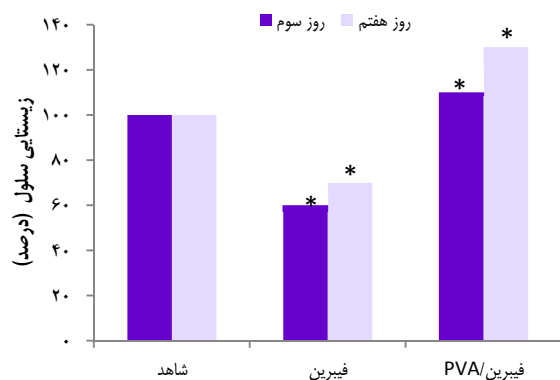


(الف)

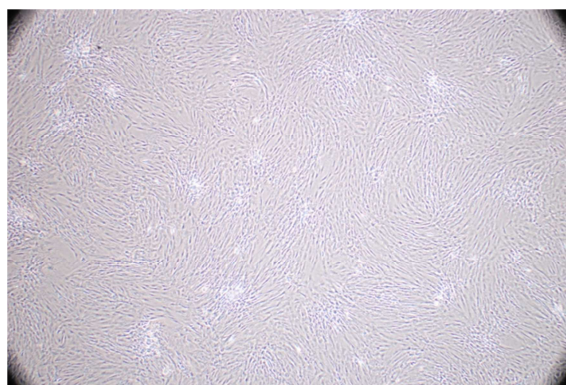


ب

شکل ۲. (الف) تصویر الیاف داربست نانو کامپوزیتی قبل از شبکه‌ای کردن، (ب) تصویر الیاف پس شبکه‌ای کردن (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ و ۴۰۰۰ برابر)



شکل ۴. نمودار نتایج آزمون زیستایی سلول در روزهای سوم و هفتم (**اختلاف معنی‌دار در گروه شاهد) ($P \leq 0.05$)



شکل ۳. تصویر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (پاساژ دوم)، میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر

کردند و تفاوت معنی داری را در گروه‌های کشت شده با داربست فیبرینی الکترورسی شده مشاهده نمودند (۱۴) که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابقت داشت و تفاوت معنی داری بین گروه‌های داربست لخته‌ی فیبرینی، داربست کامپوزیتی فیبرین/پلی وینیل الکل الکترورسی شده و گروه کشت تک لایه مشاهده گردید. این تفاوت، ممکن است به علت چسبندگی بهتر سلول بر روی سطح نانوالیاف و همچنین، تبادل بهتر مواد (به علت وجود منافذ در داربست) بین سلول با محیط کشت نسبت به سلول‌های درون لخته و کشت تک لایه باشد؛ چرا که کشت تک لایه، به صورت دو بعدی است و در کشت لخته‌ی فیبرینی نیز سلول‌های موجود در مرکز لخته، امکان تبادل کافی مواد مغذی را با محیط کشت پیدا نمی‌کنند، اما در داربست الکترورسی شده، سلول‌ها بین شبکه‌ی تورمانندی از الیاف به دام می‌افتند. این شبکه‌ی تورمانند، تک تک سلول‌ها را کنار یکدیگر نگه می‌دارد؛ در حالی که تمام سطح هر سلول با محیط کشت در ارتباط است. این عمل، مانند کاربرد ماتریکس خارج سلولی طبیعی در بدن موجود زنده می‌باشد (۸). در انتها، پیشنهاد می‌شود با افزودن نانو مواد به داربست کامپوزیتی، خواص مکانیکی آن‌ها را بهبود بخشید و از آن‌ها به عنوان داربست سلولی برای تمایز بافت غضروفی استفاده گردد و یا داربست به صورت جهت‌دار الکترورسی شود و از آن، جهت تمایز بافت عصبی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد علی صمدی به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۴۹۱۷ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان، از این معاونت جهت حمایت مالی پژوهش حاضر، سپاسگزار می‌نمایند.

پلیمرهای طبیعی و مصنوعی زیادی برای ساخت داربست‌های کامپوزیتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از میان آن‌ها پلی وینیل الکل به دلیل دارا بودن زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری مناسب، ترجیح داده می‌شود و این خواص، با استفاده از کامپوزیت کردن پلیمر با فیبرین که یک پروتئین است، به شدت تقویت می‌گردد (۱۵-۱۴).

باتوجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی، الیاف دارای ظاهری یکنواخت و بدون دانه (Bead) بودند که نشان دهنده‌ی الکترورسی موفق داربست کامپوزیتی فیبرین/پلی وینیل الکل می‌باشد و با یافته‌های Ravichandran و همکاران که داربست کامپوزیتی فیبرین/پلی گلیسرول سبکیت را الکترورسی کردند و به الیافی بدون دانه با میانگین قطر ۴۰۰ نانومتر (مطابق با قطر الیاف الکترورسی شده در مطالعه‌ی حاضر) دست یافتند (۱۴). همچنین، Perumcherry و همکاران، میانگین قطر الیاف ۵۰۰ نانومتر را از الکترورسی فیبرین به دست آوردند که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد (۱۵).

آزمون زاویه‌ی تماس نیز نشان دهنده‌ی آب‌دوستی بالای داربست کامپوزیتی است. میانگین زاویه‌ی قطره‌ی آب با داربست فیبرین/پلی وینیل الکل، از میانگین زاویه‌ی قطره آب با داربست فیبرین الکترورسی شده در مطالعه‌ی Ravichandran و همکاران (۱۴) -۷۱ درجه- کمتر بود که نشان دهنده‌ی آب‌دوستی بهتر داربست طراحی شده در مطالعه‌ی حاضر است. اندازه‌گیری میانگین درصد تخلخل، نشان دهنده‌ی تخلخل بالای داربست می‌باشد. داربستی با تخلخل بالا، امکان تبادل بهتر مواد و چسبندگی بیشتر برای سلول‌ها را ایجاد می‌کند؛ در نتیجه، باعث افزایش زیستایی سلولی می‌گردد (۸). Ravichandran و همکاران، جهت بررسی زیستایی سلولی، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف جنینی استفاده

References

- George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release* 2006; 114(1): 1-14.
- Rabie A, Esfandiari E, Fesharaki M, Sanaie M, Aminmansur B, Hashemibeni B. Access to a three dimensional osteoblasts culture originating human carvaria in Iran. *J Isfahan Med Sch* 2010; 27(102): 777-87. [In Persian].
- Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem* 2005; 70: 247-99.
- Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 2007; 28(1): 55-65.
- Le Nihouannen D, Guehennec LL, Rouillon T, Pilet P, Bilban M, Layrolle P, et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(13): 2716-22.
- Prasad CK, Muraleedharan CV, Krishnan LK. Biomimetic composite matrix that promotes endothelial cell growth for modification of biomaterial surface. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(3): 644-54.
- Sreerekha PR, Krishnan LK. Cultivation of endothelial progenitor cells on fibrin matrix and layering on dacron/polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Artif Organs* 2006; 30(4): 242-9.
- Sreerekha PR, Menon D, Nair SV, Chennazhi KP. Fabrication of fibrin based electrospun multiscale composite scaffold for tissue engineering applications. *J Biomed Nanotechnol* 2013; 9(5): 790-800.

9. Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 2008; 49(26): 5603-21.
10. Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(14): 1384-91.
11. Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* 2006; 17(14): R89-R106.
12. Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(3): 654-60.
13. Humphrey RG, Smith SD, Pang L, Sadovsky Y, Nelson DM. Fibrin enhances differentiation, but not apoptosis, and limits hypoxic injury of cultured term human trophoblasts. *Placenta* 2005; 26(6): 491-7.
14. Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Sridhar R, Ramakrishna S. Expression of cardiac proteins in neonatal cardiomyocytes on PGS/fibrinogen core/shell substrate for Cardiac tissue engineering. *Int J Cardiol* 2013; 167(4): 1461-8.
15. Perumcherry SR, Chennazhi KP, Nair SV, Menon D, Afeesh R. A novel method for the fabrication of fibrin-based electrospun nanofibrous scaffold for tissue-engineering applications. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; 17(11): 1121-30.
16. Yang SH, Wu CC, Shih TT, Chen PQ, Lin FH. Three-dimensional culture of human nucleus pulposus cells in fibrin clot: comparisons on cellular proliferation and matrix synthesis with cells in alginate. *Artif Organs* 2008; 32(1): 70-3.
17. Vallet-Regi M, Romero AM, Ragel CV, LeGeros RZ. XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. *J Biomed Mater Res* 1999; 44(4): 416-21.
18. Ghasemi-Mobarakeh L, Semnani D, Morshed M. A novel method for porosity measurement of various surface layers of nanofibers mat using image analysis for tissue engineering applications. *J Appl Polym Sci* 2007; 106(4): 2536-42.

Preparation of Fibrin/Poly Vinyl Alcohol Electrospun Nanofibers Scaffold for Tissue Engineering Applications

Ali Valiani¹, Ali Samadi², Batool Hashemibeni³, Mohammad Rafienia⁴

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, the biodegradable polymer nano-composites have particular importance in tissue engineering because of mechanical properties and good biocompatibility. The aim of this study was to design and evaluate nano-composite fibrin/polyvinyl alcohol (PVA) scaffold using electrospinning method and cell viability on it.

Methods: Nano-composite scaffold fibrin/PVA were prepared by electrospinning method while 28.5% of the polymer was formed of fibrin. The porosity of the scaffolds was calculated via scanning electron microscopy by using "Matlab" software and porosity morphology, their distribution and size of the nanofibers. Water absorption test and contact angle measurement were performed. Also, human adipose-derived stem cells were used for cell viability evaluation on scaffolds.

Findings: The mean diameter of electrospun fibrin/PVA scaffold was measured 500 nm. The average pore size and porosity of the prepared sample was 1.7 micrometers and 83.81%, respectively. The average contact angle was 31.71 degrees and 24-hour average water absorption was measured 68.5%. Evaluation test of the cell viability has a significant difference compared to control groups.

Conclusion: The results of this study show that electrospun scaffolds fibrin/PVA can be used in cartilage and nerve tissue engineering.

Keywords: Nano-fibers, Fibrin, Electrospinning, Scaffold

Citation: Valiani A, Samadi A, Hashemibeni B, Rafienia M. **Preparation of Fibrin/Poly Vinyl Alcohol Electrospun Nanofibers Scaffold for Tissue Engineering Applications.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(388): 737-44.

1- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Associate Professor, Biosensor Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Rafienia, Email: rafie_med@yahoo.com

بررسی نتایج پیش‌گویی معیار Alvarado تغییر یافته در تشخیص موارد آپاندیسیت حاد

مجتبی جواهر زاده^۱، بابک ثابت^۲، ناصر ملک‌پور علمداری^۳، بهرنگ کاظمی‌نژاد^۴،
نوید نورایی^۴، مجتبی مخبر دزفولی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دیرکرد یا تعلق در تشخیص التهاب آپاندیس، به عنوان شایع‌ترین علت شکم حاد در سراسر جهان مهم‌ترین عامل افزایش مرگ و میر در بیماران می‌باشد. لذا، تشخیص زودهنگام آن، هنوز چالشی برای جراحان محسوب می‌شود که باید بر اساس علائم و نشانه‌ها و آزمایش‌های پاراکلینیک به نتیجه‌ای مطمئن جهت اقدام به عمل جراحی یا درمان غیرجراحی برسند.

روش‌ها: در یک مطالعه‌ی مقطعی آینده‌نگر، در جمعیت هدف مراجعه‌کننده به اورژانس مرکز پزشکی بیمارستان مدرس تهران با شکم حاد در طول ۱۲ ماه، در مجموع ۲۰۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند؛ اطلاعات ۱۸۱ بیمار کامل بود و وارد مطالعه شدند. معیار Alvarado و معیار Alvarado تغییر یافته برای همه‌ی بیماران توسط دستیار ارشد مجری طرح تکمیل شد. گزارش پاتولوژی به عنوان معیار استاندارد قرار داده شد. لام‌های پاتولوژی توسط دو نفر پاتولوژیست بیمارستان شهید مدرس قرائت گردید.

یافته‌ها: دقت تشخیصی معیار Alvarado تغییر یافته ۸۱/۴ درصد در مقابل دقت ۷۴/۰ درصدی معیار Alvarado به دست آمد. معیار طراحی‌شده‌ی ما با حساسیت ۸۸/۰ در مقابل ۶۷/۷ درصد و ویژگی یکسان ۶۴/۴ در تشخیص موارد طبیعی، ارزش اخباری ۶۶/۰ درصد در مقابل ۴۱/۹ درصد در تشخیص موارد آپاندیسیت حاد و ارزش اخباری مثبت ۸۷/۳ در مقابل ۸۴/۱ درصد، از نمره‌ی اسکور بالای ۶ برخوردار بود.

نتیجه‌گیری: در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما، اضافه کردن درد شکم به همراه جنسیت مرد و C-reactive protein (CRP) کیفی به عنوان تست‌های قابل انجام، باعث بهبودی دقت تشخیصی آپاندیسیت حاد با یک معیار بالینی ساده می‌شود.

واژگان کلیدی: آپاندیسیت حاد، معیار Alvarado بهبودیافته، درد شکم

ارجاع: جواهر زاده مجتبی، ثابت بابک، ملک‌پور علمداری ناصر، کاظمی‌نژاد بهرنگ، نورایی نوید، مخبر دزفولی مجتبی. بررسی نتایج پیش‌گویی معیار

Alvarado تغییر یافته در تشخیص موارد آپاندیسیت حاد. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۸): ۷۴۵-۷۵۰

گرفته شده است (۳-۴).

یکی از محدودیت‌های این معیار در کشور ما و کشورهای آسیایی، موارد فراوان مثبت کاذب است (۵). موارد آپاندکتومی منفی که تنها بر اساس این معیار برای آن‌ها تصمیم‌گیری شده است، بالا می‌باشد. بر اساس نتایج مطالعات قبلی، مواد مثبت کاذب به دنبال استفاده از معیار Alvarado بین ۲۵ تا ۳۶ درصد گزارش شده است (۳-۵). در مقابل، در بررسی‌های انجام شده در کشور ما، ۲۵ درصد بیماران که معیار Alvarado کمتر از ۷ داشتند، در پیگیری انجام شده

مقدمه

آپاندیسیت حاد، شایع‌ترین اورژانس جراحی است (۱). بررسی‌ها نشان داده است که تنها ۵۰ درصد از بیماران در زمان مراجعه به اورژانس، علائم مشخصه‌ی آپاندیسیت حاد را دارند (۲). به همین دلیل، مواردی که با تأخیر تشخیص داده می‌شود یا مواردی که منجر به جراحی آپاندیس منفی می‌شود، شایع است (۳). یکی از معیارهای بالینی با قابلیت بالا در دهه‌ی اخیر، معیار Alvarado می‌باشد که در کشورهای مختلف به همان صورت و یا با تغییراتی به کار

- ۱- دانشیار، گروه جراحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه جراحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۵- دستیار، گروه جراحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤو: بابک ثابت

Email: sabet@crc.mui.ac.ir

مبتلا به آپاندیسیت حاد بوده و تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند (۴). همچنین، نتایج مطالعات نشان دهنده‌ی کارایی کم این معیار بالینی در زنان می‌باشد (۶). تعیین و به کارگیری معیاری با شاخص‌های عینی‌تر (Objective) و منطبق بر امکانات در دسترس، می‌تواند به تشخیص و درمان بهتر این بیماری کمک کند. با توجه به ضرورت تشخیص دقیق تر و تصمیم بالینی بهتر که منجر به کاهش موارد آپاندیسیت پاره شده و موارد آپاندکتومی منفی می‌شود، ما به فکر تهیه‌ی ابزاری با کارایی واقعی‌تر افتادیم (۴-۵).

در این بررسی، با اضافه کردن معیارهای جنس، نژاد و CRP (C-reactive protein) کیفی به‌عنوان ابزارهای در دسترس در اورژانس‌های کشور، ابزار جدیدی طراحی شد و کارایی آن را در تشخیص موارد آپاندیسیت با معیار Alvarado مقایسه گردید.

در این بررسی، با اضافه کردن معیارهای جنس، نژاد و CRP (C-reactive protein) کیفی به‌عنوان ابزارهای در دسترس در اورژانس‌های کشور، ابزار جدیدی طراحی شد و کارایی آن را در تشخیص موارد آپاندیسیت با معیار Alvarado مقایسه گردید.

روش‌ها

در یک مطالعه‌ی مقطعی آینده‌نگر در جمعیت هدف مراجعه‌کننده به اورژانس مرکز پزشکی بیمارستان مدرس تهران، به علت شکم حاد در طول ۱۲ ماه، در مجموع ۲۰۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند که اطلاعات ۱۸۱ بیمار کامل بود و وارد مطالعه شدند.

در این مطالعه، از معیارهای Alvarado و Alvarado تغییر یافته به عنوان ابزار جمع‌آوری اطلاعات استفاده شد. همچنین، علاوه بر سن، جنس و CRP کیفی، در صورتی که سونوگرافی و سی تی اسکن برای بیماران انجام شده بود، نتایج آن نیز ثبت گردید. در این بررسی منظور از نژاد، نژاد ایرانی و افغانی بود.

جمع‌آوری اطلاعات در همه‌ی بیماران توسط دستیار ارشد مجری طرح انجام شد. معیار لوکوسیتوز در معیار Alvarado بالای ۱۰ هزار در نظر گرفته شد. جهت جلوگیری از سوگرایی مشاهده‌گر، ۱۰ درصد بیماران توسط یک دستیار ارشد دیگر معاینه شدند.

گزارش پاتولوژی به عنوان معیار استاندارد قرار داده شد و لام‌های پاتولوژی توسط دو نفر پاتولوژیست بیمارستان قرائت گردید. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت (Positive predicting value یا PPV)، ارزش اخباری منفی (Negative predicting value یا NPV) و همچنین، دقت داده‌ها با آنالیز Receiver operating characteristic (ROC) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

۱۸۱ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد، ۵۵ بیمار

در بررسی پاتولوژی نمونه‌ها، ۱۳۳ نفر (۷۳/۵ درصد) گزارش پاتولوژی حاکی از التهاب و عفونت آپاندیس داشتند و در ۴۸ نفر (۲۶/۵ درصد) گزارش پاتولوژی طبیعی بود. از ۵۵ بیمار زن مورد بررسی، ۲۳ نفر (۴۱/۸ درصد) پاتولوژی طبیعی و ۳۲ نفر (۵۸/۲ درصد) آپاندیسیت حاد داشتند. از ۱۲۶ بیمار مرد مورد بررسی نیز، ۲۵ نفر (۱۹/۸ درصد) آپاندیس طبیعی و ۱۰۱ نفر (۸۰/۲ درصد) آپاندیسیت حاد داشتند. میانگین نمره‌ی معیار Alvarado در بیماران مرد برابر $2/3 \pm 6/9$ و در بیماران زن مساوی $2/1 \pm 6/2$ بود.

جدول ۱، مقایسه‌ی بیماران با پاتولوژی طبیعی و آپاندیسیت را بر اساس نوع شکایت (Symptom) نشان می‌دهد.

در جدول ۲، بیماران با پاتولوژی طبیعی و آپاندیسیت از لحاظ یافته‌های آزمایشگاهی مقایسه شده‌اند.

جدول ۱. مقایسه‌ی شکایات و علائم بالینی در بیماران مورد بررسی

مقدار	آپاندیس سالم تعداد (درصد)	آپاندیسیت تعداد (درصد)	علامت/شکایت
۰/۰۰۱	۳۱ (۶۴/۶)	۱۱۸ (۸۸/۷)	Tenderness
۰/۰۱۰	۱۱ (۲۲/۹)	۵۸ (۴۳/۶)	Rovsing's sign
۰/۱۰۰	۲۰ (۴۱/۷)	۷۱ (۵۳/۴)	Rebound tenderness
۰/۹۰۰	۵ (۱۰/۴)	۱۴ (۱۰/۵)	Guarding
۰/۲۰۰	۶ (۱۲/۵)	۲۶ (۱۹/۵)	تب
۰/۷۰۰	۳۱ (۶۴/۶)	۹۰ (۶۷/۷)	سن زیر ۳۰ سال
۰/۸۰۰	۳۹ (۸۱/۳)	۱۱۱ (۸۳/۵)	بی‌اشتهایی
۰/۰۳۰	۲۹ (۶۰/۴)	۱۰۳ (۷۷/۴)	تهوع
۰/۰۰۱	۳۹ (۸۱/۳)	۱۲۹ (۹۷)	درد سمت راست شکم
۰/۰۰۲	۱۶ (۳۳/۳)	۷۹ (۵۹/۴)	جابه‌جایی درد
۰/۰۰۳	۲۵ (۵۲/۱)	۱۰۱ (۷۵/۹)	جنس (مرد)
۰/۰۱۰	۵ (۱۲/۲)	۳۶ (۸۷/۸)	نژاد (افغان)

جدول ۲. مقایسه‌ی یافته‌های آزمایشگاهی در بیماران مورد بررسی

مقدار P	آپاندیس سالم تعداد (درصد)	آپاندیسیت تعداد (درصد)	یافته‌های آزمایشگاهی
۰/۰۹۰۰	۴۰ (۸۳/۳)	۱۲۳ (۹۲/۵)	بررسی ادرار (UA) منفی
<۰/۰۰۱۰	۲۶ (۵۴/۲)	۱۱۸ (۸۸/۷)	لوکوسیتوز
<۰/۰۰۰۱	۲۵ (۵۲/۱)	۱۱۴ (۸۵/۷)	شیفت به چپ
۰/۰۰۰۱	۲۲ (۴۵/۸)	۱۵ (۱۱/۳)	< ۱۰۰۰۰
	۲۳ (۴۷/۹)	۸۵ (۶۳/۹)	۱۰۰۰۰-۱۵۰۰۰
	۳ (۶/۳)	۳۳ (۲۴/۸)	> ۱۵۰۰۰
۰/۰۰۰۱	۳۶ (۷۵/۰)	۵۵ (۴۱/۴)	Negative
	۱۲ (۲۵/۰)	۵۱ (۳۸/۳)	Weakly Positive
	-	۲۷ (۲۰/۳)	Positive

جدول ۴. معیار بالینی تهیه شده برای پیش‌بینی آپاندیسیت

امتیاز	یافته‌ها
۰	جنس زن
۱	مرد
۰	نژاد ایرانی
۰/۵	افغان
۰/۵	تنوع
۲	درد راست شکم
۰/۵	شیفت درد
۲	Tenderness
۰/۵	Rovsing's sign
۰/۵	بررسی ادرار (U/A) طبیعی
۱	شمارش گلبول‌های سفید بالای ۱۵۰۰۰
۰/۵	۱۰۰۰۰-۱۵۰۰۰
۰	زیر ۱۰۰۰۰
۰/۵	شیفت به چپ
۱	CRP +۲
۰/۵	+۱
۰	۰

CRP: C-reactive protein

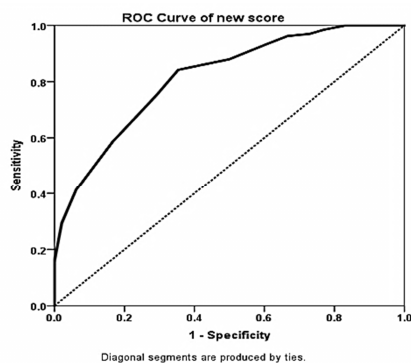
سپس، متغیرهای دارای اختلاف معنی‌دار بین دو گروه، در مدل Backward step wise conditional method logistic regression وارد شد. نتایج در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

جدول ۳. متغیرهای پیش‌بینی کننده‌ی آپاندیسیت در مدل

Regression دو حالت

CI/SI	RR	P	SE	β	Step 6
۱/۱۸-۲۸/۴	۵/۷	۰/۰۳	۰/۸۲	۱/۷۵	تعداد گلبول‌های سفید بیشتر از ۱۵۰۰۰
۱/۱۷-۱۰/۶	۳/۵	۰/۰۲	۰/۵۰	۱/۲۰	تندرنس
۱/۱-۳۱/۳	۵/۸	۰/۰۴	۰/۸۶	۱/۷۵	درد راست شکمی
۱/۱۳-۶/۵	۲/۷	۰/۰۲	۰/۴۴	۱/۰۰	جنس
۰/۸۳-۹/۲	۲/۸	۰/۰۹	۰/۶۱	۱/۰۲	U/A
۰/۸۱-۹/۰۶	۲/۷	۰/۱۰	۰/۶۱	۰/۹۹	نژاد
		۰/۰۱		-۲۰/۲۰	CRP نوبت اول
				-۱۸/۹۰	CRP نوبت دوم

SE: Standard error of mean; RR: Risk ratio; CI: Confidence interval; U/A= Urine analysis CRP: C-reactive protein



شکل ۱. منحنی حساسیت Receiver operating characteristic

(ROC) معیار Alvarado تغییر یافته در جمعیت مورد بررسی

در طراحی الگوی نهایی معیار جدید که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، همه‌ی نتایج به دست آمده در کنار نظر متخصصان مورد استفاده قرار گرفت.

منحنی حساسیت ROC معیار Alvarado تغییر یافته در جمعیت مورد بررسی در شکل ۱ آمده است. سطح زیر منحنی به عنوان شاخص دقت تشخیصی در معیار Alvarado تغییر یافته، ۰/۸۱۴ محاسبه شد.

منحنی حساسیت ROC معیار Alvarado در جمعیت مورد بررسی نیز در شکل ۲ آمده شده است. ملاحظه می‌شود که سطح زیر منحنی برای معیار Alvarado، ۰/۷۴۰ محاسبه شد.

در بررسی انجام شده در ایرلند نیز ویژگی معیار Alvarado برابر ۷۶ و موارد ارزش اخباری مثبت مساوی ۶۵ درصد در مقابل ۹۷ و ۸۸ درصد معیار بهبود یافته طراحی شده با فاکتورهای التهابی بود که در آن Rebound و جابه‌جایی درد حذف و CRP کمی و شیفت به چپ کمی اضافه شده بود (۱۰). معیار طراحی شده‌ی آنان شباهت بیشتری به معیار مورد استفاده در مطالعه‌ی ما داشت.

بر خلاف یافته‌های چند مطالعه‌ی بالا، مطالعه‌ی انجام شده در هند، ارزش اخباری مثبت معیار بالینی Alvarado را ۹۰/۴ درصد به دست آورد. در آن مطالعه، تنها ۱۰۰ بیمار ۷۰-۵ ساله مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱) و علت این اختلاف می‌تواند تعداد کم بیماران و پراکندگی زیاد سنی آن‌ها باشد.

در مطالعه‌ی انجام شده در آمریکا نیز در مردان با معیار Alvarado بالا، استفاده از سی تی اسکن به افزایش تشخیص و کم کردن موارد آپاندکتومی طبیعی کمک نکرد (۱۲) که با یافته‌های ما برای جنس مرد این مطالعه مطابقت دارد.

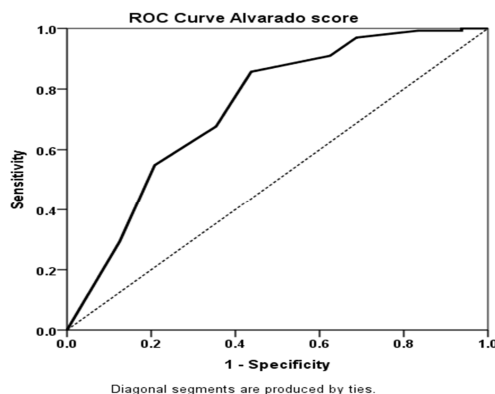
در مطالعه‌ای که در بیمارستان امام حسین (ع) تهران انجام شد، با به کار گیری معیار بهبود یافته Alvarado بر اساس وجود درد، به همراه معیار Alvarado بالای هفت، موارد مثبت بیماریابی تا ۹۳ درصد افزایش داشت (۴)؛ در معیار طراحی شده‌ی ما نیز درد شکم لحاظ و نمره‌ی دو گرفت.

در بررسی هوشمند و همکاران، دقت تشخیص معیار Alvarado در ۱۵۰ بیمار ۷۴ درصد بود (۵) که از دقت تشخیصی معیار طراحی شده‌ی ما کمتر است.

برآورد نتایج بررسی حاضر در مقایسه با سایر مطالعات نشان داد که در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما، اضافه کردن درد شکم به همراه جنس مرد و CRP کیفی به عنوان تست‌های قابل انجام باعث بهبودی دقت تشخیصی آپاندیسیت حاد با یک معیار بالینی ساده می‌شود. از آنجایی که دسترسی به سونوگرافی و سی تی اسکن در اکثر موارد اورژانس به خصوص در شهرستان‌ها در دسترس نیست، استفاده از این معیار پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی دانشجویی آقای مجتبی مخبر دزفولی است که با شماره ۵۵۷ در دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به ثبت رسیده است.



شکل ۲. منحنی حساسیت Receiver operating characteristic (ROC) معیار Alvarado در جمعیت مورد بررسی

بحث

در این بررسی، دقت تشخیصی Alvarado تغییر یافته، ۸۱/۴ درصد در مقابل دقت ۷۴/۰ درصدی معیار Alvarado به دست آمد. از آنجایی که هدف معیارهای بالینی، کاهش موارد مثبت و منفی کاذب می‌باشد، معیار طراحی شده‌ی فعلی با حساسیت بالاتر و ویژگی یکسان در تشخیص موارد طبیعی و موارد آپاندیسیت حاد از حساسیت و ویژگی بالاتری در نمره‌ی معیار بالای ۶ برخوردار بود؛ اگر چه در این بررسی، برای جلوگیری از سوگیری و لحاظ موارد اخلاقی، هیچ یک از این معیارها به تنهایی مبنای قضاوت جهت درمان بیماران قرار ننگرفت. تلاش در جهت بهبود دقت معیارهای بالینی با تغییر معیارهای Alvarado در کشورهای مختلف بر اساس بافت جمعیتی مورد توجه قرار گرفته که دلیل آن، دقت ناکافی این معیار در مطالعات مشابه بوده است (۷).

در مطالعه‌ی نصیری و همکاران در بیمارستان شریعتی تهران، دقت معیار Alvarado در جمعیت ۷۵ نفری مورد بررسی، برابر با ۶۲/۷ درصد بود و با اضافه کردن سونوگرافی به ۷۸/۷ درصد رسید (۸)؛ در حالی که دقت معیار طراحی شده‌ی فعلی بدون بهره‌گیری از سونوگرافی که همه جا در دسترس نیست، ۸۱/۴ درصد بود.

در بررسی انجام شده در سوئد، استفاده از نشانگرهای التهابی از قبیل ایترلوکین، میلوپروکسیداز، سرم آمیلوئید و ... با افزایش دقت تشخیصی آپاندیسیت حاد تا ۹۳ درصد همراه بود (۹). البته، بررسی این نشانگرهای التهابی پرهزینه است و در عمل، در کشور ما مقرون به صرفه نیست.

References

1. Di Saverio S, Sibilio A, Giorgini E, Biscardi A, Villani S, Coccolini F, et al. The NOTA Study

(Non Operative Treatment for Acute Appendicitis): prospective study on the efficacy

- and safety of antibiotics (amoxicillin and clavulanic acid) for treating patients with right lower quadrant abdominal pain and long-term follow-up of conservatively treated suspected appendicitis. *Ann Surg* 2014; 260(1): 109-17.
2. Lewis SRR, Mahony PJ, Simpson J. Appendicitis. *BMJ* 2011; 343: 1-3.
 3. Andersson M, Ruber M, Ekerfelt C, Hallgren HB, Olaison G, Andersson RE. Can new inflammatory markers improve the diagnosis of acute appendicitis? *World J Surg* 2014; 38(11): 2777-83.
 4. Kariman H, Shojaee M, Sabzghabaei A, Khatamian R, Derakhshanfar H, Hatamabadi H. Evaluation of the Alvarado score in acute abdominal pain. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2014; 20(2): 86-90.
 5. Hooshmand B, Shokouh-Saremi A, Noferesti A, Yaghoubi MA, Elahifar A. Diagnostic accuracy of Alvarado score in the diagnosis of acute appendicitis. *Zahedan J Res Med Sci* 2012; 13(8): 18-21. [In Persian].
 6. Mariadason JG, Wang WN, Wallack MK, Belmonte A, Matari H. Negative appendectomy rate as a quality metric in the management of appendicitis: impact of computed tomography, Alvarado score and the definition of negative appendectomy. *Ann R Coll Surg Engl* 2012; 94(6): 395-401.
 7. Apisarntharak P, Suvannarerg V, Pattaranutaporn P, Charoensak A, Raman SS, Apisarntharak A. Alvarado score: can it reduce unnecessary CT scans for evaluation of acute appendicitis? *Am J Emerg Med* 2015; 33(2): 266-70.
 8. Nasiri S, Mohebbi F, Sodagari N, Hedayat A. Diagnostic values of ultrasound and the Modified Alvarado Scoring System in acute appendicitis. *Int J Emerg Med* 2012; 5(1): 26.
 9. Andersson M, Ruber M, Ekerfelt C, Hallgren HB, Olaison G, Andersson RE. Can new inflammatory markers improve the diagnosis of acute appendicitis? *World J Surg* 2014; 38(11): 2777-83.
 10. Kollar D, McCartan DP, Bourke M, Cross KS, Dowdall J. Predicting acute appendicitis? A comparison of the Alvarado score, the Appendicitis Inflammatory Response Score and clinical assessment. *World J Surg* 2015; 39(1): 104-9.
 11. Vijay BR. Role of Alvarado score in the diagnosis of acute appendicitis. *Int J Res Med Sci* 2013; 1(4): 404-8.
 12. Mariadason JG, Wang WN, Wallack MK, Belmonte A, Matari H. Negative appendectomy rate as a quality metric in the management of appendicitis: impact of computed tomography, Alvarado score and the definition of negative appendectomy. *Ann R Coll Surg Engl* 2012; 94(6): 395-401.

The Predictive Value of Modified Alvarado Score in Diagnosis of Acute Appendicitis

Mojtaba Javaherzadeh¹, Babak Sabet², Naser Malekpour-Alamdari², Behrang Kazeminejad³, Navid Noraee⁴, Mojtaba Mokhber-Dezfolly⁵

Original Article

Abstract

Background: Tardiness or delay in diagnosis of appendicitis, as the most common cause of acute abdomen around the world, is the most important factor in increasing mortality rate in patients. Therefore, early diagnosis is still a challenge for surgeons to be based on signs and symptoms and laboratory tests to make them sure to decide about the surgery.

Methods: In a cross-sectional antegrade study, 200 patient who had come with acute abdominal pain to Modarres hospital emergency room, Tehran, Iran, in 12 months were enrolled; the data of 181 patient were complete that was relevant to our study. Alvarado and modified Alvarado scales were used for data collection by the chief resident of surgery. Pathology report was the standard criterion in this survey.

Findings: The accuracy of modified Alvarado score in diagnosis of appendicitis was 81.4% in comparison with 74.0% of Alvarado score. Our modified score with the sensitivity of 88.0% (vs. 67.7%) and the same specificity of 64.4% in detecting normal cases and positive predicting value (PPV) of 66.0% (vs. 41.9%) in diagnosis of acute appendicitis and positive predicting value of 87.3% (vs. 84.1%) in cases of score of more than of 6 was a better score compare to Alvarado score.

Conclusion: Adding abdominal pain, male gender, and qualitative C-reactive protein (CRP) to Alvarado score was resulted in obtaining a higher accuracy in the diagnosis of acute appendicitis.

Keywords: Acute appendicitis, Modified Alvarado scale, Abdominal pain

Citation: Javaherzadeh M, Sabet B, Malekpour-Alamdari N, Kazeminejad B, Noraee N, Mokhber-Dezfolly M. **The Predictive Value of Modified Alvarado Score in Diagnosis of Acute Appendicitis.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(388): 745-50.

1- Associate Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Anesthesiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Resident, Department of Anesthesiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Babak Sabet, Email: sabet@crc.mui.ac.ir

گزارش یک مورد درمان موفقیت‌آمیز Thrombotic Thrombocytopenic Purpura در حاملگی

ملیحه امیریان^۱، فائزه جعفریان^۲، الهام امینی^۳

گزارش مورد

چکیده

مقدمه: پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک (Thrombotic thrombocytopenic purpura یا TTP) یک فرم شدید از میکروآنژیوپاتی‌های ترومبوتیک است. مکانیسم این بیماری، به فعالیت (ADAMTS-13) A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif member 13 وابسته است. این پروتئاز، عامل فون ویلبراند (Von Willebrand factor یا VWF) را می‌شکند. این بیماری با کاهش شدید ADAMTS-13 و افزایش غلظت مولتی‌مرهای بزرگ VWF بروز می‌کند که منجر به رسوب وسیع میکرو واسکولار پلاکت در نتیجه‌ی ترومبوسیتوپنی و انسداد عروق کوچک و به دنبال آن، آنمی همولیتیک می‌شود. شیوع بیماری در حاملگی به ۱ در ۲۵۰۰۰ می‌رسد. سطح VWF در تریمستر سوم، افزایش و سطح ADAMTS-13 کاهش می‌یابد. قبل از شروع درمان‌های اختصاصی مثل پلاسمافرز مرگ و میر مادر در حدود ۸۵ درصد و مرگ و میر جنین به ۸۰ درصد می‌رسد. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، مروری بر جدیدترین نحوه‌ی ارزیابی و درمان بیماری TTP در تریمستر سوم حاملگی می‌باشد.

معرفی بیمار: بیمار خانم ۳۰ ساله با حاملگی ترم با شکایت تهوع و استفراغ و افزایش وزن و فشار خون بالا بود که در آزمایش‌های اولیه همولیز و افزایش آنزیم‌های کبدی و پلاکت پایین داشت. ابتدا بیمار با شک به سندرم Hemolysis elevated liver enzyme low platelet count (HELLP) بستری شد. به دلیل ادامه‌ی افت پلاکت و همولیز، بیمار تحت سزارین اورژانسی قرار گرفت. بعد از سزارین، با توجه به آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتیک و تشخیص TTP، پلاسمافرز شروع شد. بیمار بهبود یافت و مرخص شد.

نتیجه‌گیری: TTP با حاملگی ارتباط دارد. با توجه به نقش درمانی قطعی و مؤثر پلاسمافرز در TTP، توصیه می‌شود در بیمارانی که از نظر آزمایشگاهی و بالینی شک قوی به TTP وجود دارد، پلاسمافرز شروع شود.

واژگان کلیدی: پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک، حاملگی، پلاسمافرز

ارجاع: امیریان ملیحه، جعفریان فائزه، امینی الهام. گزارش یک مورد درمان موفقیت‌آمیز Thrombotic Thrombocytopenic Purpura در

حاملگی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۸): ۷۵۱-۷۵۵

A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin)

(type 1 motif member 13) وابسته است. این پروتئاز به طور طبیعی، VWF ترشح شده روی سلول‌های اندوتلیال را می‌شکند. این بیماری با کاهش شدید ADAMTS-13 و در نتیجه، افزایش غلظت مولتی‌مرهای بزرگ عامل فون ویلبراند بروز می‌کند. تجمع مولتی‌مر VWF و رسوب پلاکت، منجر به ترومبوسیتوپنی و انسداد عروق کوچک و به دنبال آن، آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتیک می‌شود (۳).

به علت میکروترومبوز گسترده در این بیماری، مغز و کلیه‌ها و

مقدمه

پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک (TTP) یا Thrombotic thrombocytopenic purpura) یک فرم شدید از آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتیک است که در آن، ترومبوز میکرو واسکولار با تجمع پلاکت‌ها و عامل فون ویلبراند (VWF یا Von willebrand factor) ایجاد می‌گردد (۱). این بیماری، با شیوع ۵ درصد در زنان باردار ترومبوسیتوپنیک در بیمارستان‌های سطح ۳ دیده می‌شود (۲).

مکانیسم فیزیوپاتولوژیک بیماری به فعالیت ADAMTS-13

۱- استادیار، گروه زنان و مامایی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- دستیار، گروه زنان و مامایی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- گروه مامایی، دانشکده‌ی پرستاری مامایی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

نویسنده‌ی مسؤو: فائزه جعفریان

در دوران بارداری در تشخیص افتراقی با اکلامپسی و پره‌اکلامپسی، سندرم Hemolysis elevated liver enzyme low platelet count (HELLP)، کبد چرب حاد حاملگی، Hemolytic uremic syndrome (HUS) و (DIC) Disseminated intravascular coagulation قرار می‌گیرد (۳).

TTP در حاملگی، منجر به افزایش ناخوشی و مرگ و میر در مادر و جنین می‌گردد (۴)؛ به طوری که تا قبل از شروع درمان‌های اختصاصی مثل پلاسمافرز، مرگ و میر مادر حدود ۸۵ درصد و مرگ و میر جنین حدود ۸۰ درصد بوده است (۳).

در گزارش حاضر، مورد نادری از حاملگی ۳۹ هفته با TTP معرفی می‌گردد. هدف از معرفی این بیمار، مروری بر جدیدترین نحوه‌ی ارزیابی و درمان بیماری TTP در تریمستر سوم حاملگی می‌باشد.

معرفی بیمار

بیمار خانم ۳۰ ساله‌ای بود که در حاملگی اول خود با سن بارداری ۳۹ هفته و ۵ روز با شکایت تهوع، استفراغ و سرگیجه از دو هفته قبل به بیمارستان مراجعه کرده بود. فشار خون سیستول و دیاستول بیمار، ۱۴ و ۹ میلی‌متر جیوه و سایر علائم حیاتی بیمار طبیعی بود. بیمار، افزایش وزن ۱۲ کیلوگرم در هفته‌ی اخیر را ذکر می‌کرد. سردرد، تاری دید و درد اپی‌گاستر در موقع مراجعه وجود نداشت. ادم ۲+ در اندام تحتانی وجود داشت. خونریزی واژینال و انقباض رحمی وجود نداشت و سمع قلب جنین طبیعی بود.

بیمار با تشخیص سندرم HELLP بستری شد. سولفات منیزیم با دوز اولیه‌ی ۴ گرم و دوز نگهدارنده‌ی ۲ گرم در ساعت شروع شد. ۱۰ واحد پلاکت درخواست شد و ۴ واحد Packed cell کراس میچ و آماده شد. جهت ختم بارداری، سوند اکسترا آمیون گذاشته شد. در نتایج آزمایش‌های ۶ ساعت بعد از پذیرش، میزان PLT برابر ۳۰۰۰ بود (جدول ۱).

سایر اندام‌ها درگیر می‌شوند. علائم بالینی متعددی از جمله سردرد، علائم فوکال عصبی، کما و تشنج بروز می‌کند. سایر علائم بالینی غیر اختصاصی شامل خستگی، درد شکمی، تهوع، استفراغ و درد قفسه‌ی سینه و درگیری کلیوی ممکن است دیده شود. همچنین، آنمی همولیتیک غیر ایمنی با شیسیتوسیتوز (Schistocytosis) و افزایش میزان LDH Lactate dehydrogenase (LDH) و ترومبوسیتوپنی مصرفی وجود دارد (۱).

ایم بیماری، دو فرم مادرزادی و اکتسابی دارد. TTP مادرزادی ۵ درصد موارد بیماران و نوع اکتسابی ۹۵ درصد را شامل می‌شود. در TTP اکتسابی، علاوه بر کاهش ADAMTS-13، آنتی‌بادی‌های ضد متالوپروتئاز نیز وجود دارد (۴). در نوع مادرزادی، کاهش ADAMTS-13 به علت جهش ژن می‌باشد. از این رو، آنتی‌بادی‌های ضد متالوپروتئاز در این بیماری وجود ندارد (۳).

TTP مادرزادی به طور کلاسیک در نوزادان و بچه‌ها تظاهر می‌کند، اما بروز علائم بالینی TTP مادرزادی ممکن است تا زمان حاملگی در بالغین به تأخیر بیفتد (۴). فرم اکتسابی TTP مانند سایر اختلالات اتوایمیون، اغلب زنان جوان را که در دهه‌های سوم و چهارم زندگی (در سنین تولید مثلی) هستند، مبتلا می‌کند (۵).

حدود ۲۵ درصد حملات حاد TTP، ممکن است در حاملگی یا دوره‌ی نفاس اتفاق بیفتد. از این رو، بین حاملگی و بیماری TTP ارتباط وجود دارد (۵).

در یک حاملگی طبیعی، مقادیر عامل فون ویلبراند و ADAMTS-13 تغییر می‌کند و عامل فون ویلبراند در تریمستر سوم افزایش و ADAMTS-13 به طور پیش‌رونده کاهش می‌یابد؛ به طوری که در بعضی از خانم‌ها در سه ماهه‌ی سوم حاملگی، مقدار طبیعی آن به ۳۰-۲۵ درصد می‌رسد (۵). به همین دلیل، این بیماری در طی تریمستر سوم بیشتر بروز می‌کند.

از آن جایی که TTP یک بیماری همولیتیک میکروآنژیوپاتیک است،

جدول ۱. نتایج آزمایش‌های بیمار در مقاطع زمانی مختلف

AST	ALT	LDH	PT	PTT	Hb	HCT	Retic	PLT	Cr	BUN	Proteinuria	زمان آزمایش
۱۴۲	۱۱۰	۲۴۹۹	۱۴	۴۰	۶/۱	۱۹/۲	٪۳	۱۴۰۰۰	۰/۹	۶۵	۲ ⁺	بدو پذیرش
۱۴۸	۱۳۰	۲۸۰۰	-	-	۵/۵	۱۸	-	۳۰۰۰	-	-	-	۶ ساعت بعد از پذیرش
۱۵۵	۱۲۰	۳۸۰۰	۱۳	۴۲	۴	۱۲	٪۳/۲	۵۵۰۰۰	۰/۹	۷۵	۱ ⁺	۶ ساعت بعد از سزارین
۱۲۰	۹۶	۲۵۰۰	-	-	-	-	-	۷۰۰۰۰	-	-	-	۲۴ ساعت بعد از شروع پلاسمافرز

AST: Aspartate transaminase; ALT: Alanine transaminase; LDH: Lactate dehydrogenase; PT: Protrombine time; PTT: Partial thromboplastine time; Hb: Hemoglobin; HCT: Hematocrit; Retic: Reticulocytes; PLC: Platelet count; Cr: Creatinine; BUN: Blood urea nitrogen

پلاسمافرز به صورت روزانه تا طبیعی شدن LDH و PLT ادامه یافت. تعداد جلسات پلاسمافرز ۱۴ جلسه بود. پلاکت به ۱۱۰۰۰۰، LDH به ۲۰۰ و هموگلوبین به ۹ رسید. بیمار دو هفته بعد از سزارین با حال عمومی خوب مرخص شد.

بحث

با توجه به علائم بالینی فشار خون بالا، پروتئینوری، ترومبوسیتونی و اختلال آنزیم‌های کبدی در بیمار مورد مطالعه، سندرم HELLP، پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک (TTP)، انعقاد منتشر داخل عروقی (DIC) و کبد چرب حاملگی در تشخیص افتراقی مطرح می‌شود. اغلب بیماران سندرم HELLP، با ختم حاملگی بهبود می‌یابند، اما سندرم غیر معمولی توصیف شده است که در آن، پره‌اکلامپسی شدید-اکلامپسی، با وجود زایمان پابرجا باقی می‌ماند که تعویض پلاسما را در این بیماران توصیه می‌کنند (۷). معیار Tennessee که توسط Sibai توضیح داده شده است، جهت تشخیص سندرم HELLP کامل به کار می‌رود و شامل معیارهای آزمایشگاهی (PLT کمتر از ۱۰۰۰۰۰، AST یا ALT بیشتر از ۷۰، LDH بیشتر از ۶۰۰ و Billirubin بیشتر از ۱/۲ mg/dl) و وجود شیتوسیت و Burr cells در لام خون محیطی که نشان دهنده آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتی است، می‌باشد (۸).

با وجود این که در پره‌اکلامپسی شدید، افزایش غلظت خون و بالا رفتن هماتوکریت به علت افزایش نفوذ پذیری مویرگ‌ها دیده می‌شود، در سندرم HELLP به علت همولیز، افت هماتوکریت مشاهده می‌شود. گاهی سندرم HELLP با DIC همراه می‌شود که با اختلال در فرایند انعقادی و طولانی شدن PT (Protrombine time) و Partial thromboplastine time (PTT) همراه است، اما در بیمار مورد نظر، DIC دیده نشد (۸).

بسیاری از تظاهرات بالینی TTP در سندرم HELLP هم دیده می‌شود. مدیریت متفاوت این دو سندرم، تشخیص دقیق را ضروری می‌سازد. برخلاف بیماری HELLP، ختم حاملگی و درمان محافظتی در TTP کاربردی ندارد. با توجه به شیوع بالاتر سندرم HELLP نسبت به TTP، در بارداری همیشه HELLP به عنوان تشخیص اولیه مطرح می‌شود.

با وجود این، مهم است که همیشه هر دو بیماری را به عنوان تشخیص افتراقی برای یک زن با یافته‌های پیش‌گفته چه در زمان قبل از زایمان و چه در مراحل اولیه‌ی بعد از زایمان در نظر داشته باشیم. این مسأله نیز به علت انتخاب‌های درمانی متفاوت آن‌ها و هم به علت بالاتر بودن مرگ و میر مادری و جنینی در TTP می‌باشد (۹). با توجه به تأثیر درمانی قابل توجه، ختم بارداری و درمان محافظه‌کارانه

به علت هموگلوبین ۵/۵ و با توجه به این که هر واحد Packed cell میزان هماتوکریت را ۳ درصد افزایش می‌دهد، جهت رساندن هموگلوبین به ۸، جهت عمل جراحی اورژانسی، بیمار ۲ واحد Packed cell دریافت کرد.

حداقل پلاکت مورد نیاز جهت عمل جراحی اورژانسی ۵۰۰۰۰ می‌باشد. با توجه به پلاکت ۳۰۰۰ و این که هر واحد پلاکت ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰۰ شمارش پلاکتی را افزایش می‌دهد، جهت رساندن پلاکت بیمار به بالای ۵۰۰۰۰، ۱۰ واحد پلاکت تزریق شد.

بعد از دریافت ۲ واحد Packed cell و ۱۰ واحد پلاکت تحت بیهوشی عمومی (به علت ترومبوسیتونی) سزارین اورژانسی انجام شد. محصول سزارین، نوزاد پسر، ترم و سالم به وزن ۳۴۰۰ گرم بود. بعد از سزارین بیمار به ICU Intensive care unit منتقل شد. ۶ ساعت بعد از سزارین، هموگلوبین به ۴ رسید (جدول ۱).

در معاینه، رحم جمع شده بود و بیمار خونریزی واژینال نداشت. علائم حیاتی بیمار شامل RR = ۲۰ (Respiratory rate)، PR = ۱۲۰ (Pulse rate) و فشار خون سیستول و دیاستول بیمار، ۱۱ و ۶ میلی‌متر جیوه بود. بیمار هوشیار بود. در سونوگرافی اورژانسی از شکم و لگن، کبد، طحال و مجاری صفراوی طبیعی بود. رحم در حد پست پارتوم بود. مایع آزاد مختصر در کلدوساک خلفی دیده شد. با توجه به موارد پیش‌گفته، خونریزی پست پارتوم رد شد و برای اصلاح آنمی، بیمار ۴ واحد Packed cell دریافت کرد.

نشانه‌های پنج‌گانه‌ی TTP شامل ترومبوسیتونی، تب، اختلالات نورولوژیک، اختلال کلیوی و کم خونی همولیتیک است. علائم نورولوژیک، به طور تقریبی در ۵۰ درصد بیماران به وجود می‌آیند و شامل سردرد، تغییر هوشیاری، حملات تشنجی، تب یا سکنه‌ی مغزی است.

در بیمار مورد مطالعه، علائم نورولوژیک، تب و اختلال کلیوی وجود نداشت. ویژگی قابل مشاهده در خون محیطی، قطعه قطعه شدن اریتروسیت‌ها همراه با شیتوسیتوز است. تعداد رتیکولوسیت‌ها و گلبول‌های قرمز هسته‌دار افزایش می‌یابد. میزان LDH افزایش و غلظت هاپتوگلوبین کاهش می‌یابد.

در لام خون محیطی بیمار مورد مطالعه، ۵ درصد شیتوسیت (Schistocyte) دیده شد. با توجه به آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتیکی و ترومبوسیتونی و مشاهده‌ی شیتوسیت در لام خون محیطی، تشخیص TTP محرز شد. کاتتر ورید ژوگولار جهت بیمار، گذاشته شد و پلاسمافرز روزانه شروع شد. آزمایش‌ها ۲۴ ساعت بعد از شروع پلاسمافرز بهبودی Liver function test (LFT)، LDH و Platelet blood test (PLT) را نشان داد (جدول ۱).

مطرح نشده است. در یک مطالعه، میزان متوسط شیستوسیت در TTP ۸ درصد، در جمعیت طبیعی ۰/۰۵ درصد و در پره‌اکلامپسی ۰/۲۵ درصد می‌باشد. از این رو، شیستوسیت بیشتر از ۱ درصد به ویژه در غیاب سایر بیماری‌های میکروآنژیوپاتی‌ک ترومبوتیک به طور قوی مطرح‌کننده‌ی TTP است (۱۳). در بیمار معرفی شده، میزان شیستوسیت برابر ۵ درصد گزارش شد.

درمان پلاسمافرز (تعویض پلاسما) فقط در بیمارستان‌های سطح سوم قابل انجام است. با توجه به عدم دسترسی تعویض پلاسما در تمام نقاط کشور و با توجه به این که وقتی تعویض پلاسما در دسترس نمی‌باشد، استفاده از تزریقات پلاسما‌ی تازه منجمد (FFP یا Fresh frozen plasma) درمان مناسب است. از این رو، می‌توان در بیمارستان مشکوک به TTP، درمان با تزریق FFP را تا زمان رسیدن بیمار به بیمارستان‌های سطح سوم و انجام پلاسمافرز شروع نمود.

مرگ و میر مادری وابسته به TTP، می‌تواند از ۹۰ درصد در بیمارستان‌های سطح سوم و کمتر از ۱۰ درصد در زنانی که بلافاصله تحت درمان با پلاسما قرار گرفته‌اند، برسد. کارایی درمان پلاسما، می‌تواند به جایگزینی فعالیت ADAMTS-13 نسبت داده شود. با این وجود، تصمیم‌گیری شروع تعویض پلاسما همیشه آسان نیست و فقط زمانی درمان شروع می‌شود که بعد از زایمان بهبود حاصل نشده یا علائم بالینی بیمار بدتر شود (۹).

در سندرم HELLP در صورتی که این بیماری بعد از زایمان بهبود نیابد، نیاز به بازنگری تشخیص و در نظر گرفتن احتمال TTP می‌باشد (۱۰). در بیمار معرفی شده، با توجه به عدم بهبودی بعد از ختم بارداری، TTP مطرح شد.

در بیماران با سندرم HELLP در صورتی که ۲۴-۱۲ ساعت به درمان با دگزامتازون پاسخ ندهند و از نظر آزمایشگاهی و بالینی شک قوی به TTP وجود داشته باشد، پلاسمافرز شروع می‌شود (۱۱). همچنین، ذکر این نکته ضروری است که TTP و HELLP ممکن است در حدود ۱۷ درصد از موارد هم‌زمان وجود داشته باشند (۹). بنا بر این، پلاسمافرز در بیماران HELLP با درگیری ریوی و نارسایی کلیوی و DIC استفاده می‌شود (۷). نکته‌ی مهم در تشخیص افتراقی TTP با HELLP، اندازه‌گیری سطح آنزیم متالوپروتئاز (ADAMTS-13) می‌باشد. در صورتی که سطح این آنزیم کمتر از ۱۰ درصد باشد، TTP تشخیص داده می‌شود (۲).

متأسفانه، در حال حاضر آزمایش اندازه‌گیری سطح آنزیم متالوپروتئاز به صورت معمول در دسترس نمی‌باشد و از این رو، وجود شیستوسیت در لام خون محیطی همراه با علائم بالینی آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتی‌ک به طور قوی مطرح‌کننده‌ی این بیماری است.

تا به امروز، درصد استاندارد از حضور شیستوسیت در لام خون محیطی جهت افتراق TTP از سایر آنمی‌های میکروآنژیوپاتی‌ک

References

- Falter T, Kremer Hovinga JA, Lackner K, Fullemann HG, Lammle B, Scharer I. Late onset and pregnancy-induced congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie* 2014; 34(3): 244-8.
- Delmas Y, Helou S, Chabanier P, Ryman A, Pelluard F, Carles D, et al. Incidence of obstetrical thrombotic thrombocytopenic purpura in a retrospective study within thrombotic pregnant women. A difficult diagnosis and a treatable disease. *BMC Pregnancy Childbirth* 2015; 15: 137.
- Gasparri ML, Bellati F, Brunelli R, Perrone G, Pecorini F, Papadia A, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura during pregnancy versus imitator of preeclampsia. *Transfusion* 2015; 55(10): 2516-8.
- Scully M, Thomas M, Underwood M, Watson H, Langley K, Camilleri RS, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood* 2014; 124(2): 211-9.
- Ferrari B, Maino A, Lotta LA, Artoni A, Pontiggia S, Trisolini SM, et al. Pregnancy complications in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: a case-control study. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 193.
- Ugur BA, Karaselek MA, Camli K. Successful management of thrombotic thrombocytopenic purpura associated with pregnancy. *Transfus Apher Sci* 2014; 50(3): 433-7.
- Vafaemanesh J, Parham M. A case report of successful treatment of hellp syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura by plasmapheresis. *Qom Univ Med Sci J* 2012; 6(4): 117-25. [In Persian].
- Corton MM, Leveno K, Bloom S, Spong CY, Dashe J. *Williams Obstetrics*. 24th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2014. p. 742, 1116.
- Mwita JC, Vento S, Benti T. Thrombotic Thrombocytopenic purpura-haemolytic uremic syndrome and pregnancy. *Pan Afr Med J* 2014; 17: 255.
- Pitton MA, Petolillo M, Papi S, Grismondi GL, Masin GP, Forcellini F. Hemolytic uremic syndrome in twin pregnancy at 32 weeks gestation with HELLP syndrome. Case report. *Minerva Ginecol* 2001; 53(4): 279-81. [In Italian].
- Rehberg JF, Briery CM, Hudson WT, Bofill JA, Martin JN, Jr. Thrombotic thrombocytopenic purpura masquerading as hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets (HELLP) syndrome in late pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006; 108(3 Pt 2): 817-20.
- Burns ER, Lou Y, Pathak A. Morphologic diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 2004; 75(1): 18-21.

Successful Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Pregnancy: A Case Report

Maliheh Amiriam¹, Faezeh Jafarian², Elham Amini³

Case Report

Abstract

Background: Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is severe form of thrombotic microangiopathies. Mechanism of this disease has been linked to a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif member 13 (ADAMTS13) activity. This protease cleaves von Willebrand factor (VWF). This disease manifest with severe deficiency in ADAMTS13 and increase concentration of ultralarge multimers of VWF that leads to extensive microvascular platelet deposition thereupon thrombocytopenia and small-vessel occlusion, followed by hemolytic anemia. Incidence of disease during pregnancy is 1 in 25,000. VWF levels increase in third trimester and ADAMTS13 levels reduce. Before start of specific treatments such as plasmapheresis, maternal mortality was about 85% and fetal mortality approached 80%. Our purpose is review of the newest method of investigation and management the disease of TTP in the third trimester of pregnancy.

Case Report: Patient is 30 years old woman with term pregnancy with complaint of nausea, vomiting, weight gain and high blood pressure. In primary lab data has hemolysis, elevated liver enzyme and low platelet. She admitted with suspicion of hemolysis elevated liver enzyme low platelet count (HELLP) syndrome. Because of ongoing decrease of platelet count and hemolysis she underwent emergency caesarian section. After caesarian section as regards hemolytic microangiopathic anemia and diagnosis of TTP plasmapheresis started. The patient finally improved and was discharged.

Conclusion: TTP is correlated with pregnancy. Regarding the definite and effective therapeutic impress of plasmapheresis in TTP, it is advised to start plasmapheresis in patients whose laboratory and clinical data are suspicious to TTP.

Keywords: Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), Pregnancy, Plasmapheresis

Citation: Amiriam M, Jafarian F, Amini E. **Successful Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Pregnancy: A Case Report.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(388): 751-5.

1- Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2- Resident, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Department of Obstetrics, School of Nursing and Obstetrics, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Faezeh Jafarian, Email: jafarianf901@mums.ac.ir

Editorial Board (In alphabetical order)

1. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada
2. **Ali Akhavan** MD, Assistant Professor of Radiotherapy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. **Mohammadreza Akhlaghi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, 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, Leuis Weil University, USA
7. **Reza Bagherian-Sararoudi** PhD, Associate Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
8. **Majid Berekatain** MD, Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
9. **Ken Bassett** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
10. **Ahmad Chitsaz** MD, Professor of Neurology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
11. **Afsoon Emami** MD, Associate Professor of Nephrology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
12. **Shahin Emami** Department of Biochemistry, Saint Antoine Hospital, Paris, France
13. **Ebrahim Esfandiary** MD, PhD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
14. **Faramarz Esmailbeigi** MD, Professor of Endocrinology, School of Medicine, California, USA
15. **Ahmad Esmailzadeh** PhD, Professor of Nutrition, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
16. **Ziba Farajzadegan** MD, Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
17. **Aziz Gahari** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
18. **Jafar Golshahi** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Mostafa Hashemi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
20. **Saied Morteza Heidari** MD, Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
21. **Ali Hekmatnia** MD, Professor of Radiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
22. **Fariba Iraji** MD, Professor of Dermatology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
23. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
24. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics & Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
25. **Majid Kheirollahi** PhD, Associate Professor of Genetics and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
26. **Parvin Mahzooni** MD, Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
27. **Marjan Mansourian** PhD, Assistant Professor of Epidemiology and Biostatistics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
28. **Mohammad Mardani** MD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
29. **Mehdi Modares** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
30. **Etiye Moghisi** MD, Professor of Endocrinology, Endocrine and Metabolism Research Center, USA
31. **Mohammadreza Nourbakhsh** PhD, Professor of Physiotherapy, Georgia, USA
32. **Farzin Pourfarzad** PhD, Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands
33. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
34. **Maryam Radahmadi** PhD, Assistant Professor of Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
35. **Hassan Razmju** MD, Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
36. **Reza Rouzbahani** MD, Assistant Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
37. **Masih Saboori** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
38. **Mohammad Reza Safavi** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
39. **Rasoul Salehi** PhD, Assistant Professor of Genetics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
40. **Mansour Sholevar** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
41. **Mohammadreza Sharifi** MD, PhD, Professor of Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
42. **Masoud Soheilian** MD, Professor of Ophthalmology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran



JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 34, No. 388, 4th Week August 2016

Isfahan University of Medical Sciences

Chairman: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

Associate Editor: **Maryam Radahmadi PhD**

Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

Email: publications@mui.ac.ir

Office:

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

Tel/fax: +98 31 37922291

Email: jims@med.mui.ac.ir

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

Executive Manager: Ali Moradi, Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy Edit, Layout Edit, Proof Reading, Design, Print and Online Support:

FaRa Publishing House (Farzanegan Radandish)

Email: farapublications@gmail.com

<http://farapub.com>

Tel/fax: +98 31 32224382

Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexes

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

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

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