



## مقاله های پژوهشی

- بررسی بیان نسبی miR-103 در سلول های تک هسته ای خون محیطی مدل رت مبتلا به دیابت نوع ۲ و پیش دیابت ... ۱۷۴۶  
 نسیمه وطن دوست، صدیقه مؤمن زاده، سارا کمالی، دکتر رسول صالحی
- اختلال در مسیر پیام رسانی Wnt از طریق متیلاسیون ژن های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلویدی حاد در زمان تشخیص بیماری ... ۱۷۵۷  
 علی قاسمی، دکتر محسن محمدی، عباس قوطاسلو، کاظم غفاری، صادق عباسیان
- بررسی نتایج حاصل از درمان توسط تکنیک های کمک باروری در بیمارستان شهید بهشتی اصفهان ... ۱۷۶۷  
 دکتر روشنگر ابوترابی، دکتر ویدا رضوی، شکوفه بقازاده، لاله شارق، فاطمه سادات مصطفوی

## مقاله مروری

- مروری بر علل مغایرت گروه بندی مستقیم و معکوس سیستم ABO، توزیع فراوانی این عوامل در ایران و جهان و راهکارهای مرتفع سازی ... ۱۷۸۲  
 نرگس سیفی زاده، نیر سیفی زاده، دکتر مجید فرش دوستی حق

## مقاله کوتاه

- بررسی توزیع فراوانی آنتی بیوتیک های مصرف شده در بخش مراقبت های ویژه مرکز آموزشی-درمانی الزهرا (س) در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی در بیمارستان ... ۱۷۹۷  
 دکتر کامیار مصطفوی زاده، دکتر بهروز عطایی، رویا آزاد، امید پیرحاجی، علی مهرابی کوشکی، حمیدرضا صادقیان

## Original Articles

- Evaluation of miR-103 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 2 Diabetic and Prediabetic Rats ..... 1756  
 Nasimeh Vatandoust, Sedigheh Momenzadeh MSc, Sara Kamali, Rasoul Salehi PhD
- Dysregulation of the Wnt Signaling Pathway through Methylation of WIF1 and DKK1 Genes in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) at the Time of Diagnosis ..... 1766  
 Ali Ghasemi MSc, Mohsen Mohammadi PhD, Abbas Ghotaslou MSc, Kazem Ghaffari MSc, Sadegh Abbasian MSc
- Evaluation of the Success Rate of Assisted Reproductive Techniques (ART) in Shahid Beheshti Infertility Center, Isfahan, Iran ..... 1781  
 Roshanak Abutorabi PhD, Vida Razavi MD, Shekufeh Baghazade MSc, Laleh Sharegh MSc, Fatemeh Sadat Mostafavi MD, PhD

## Review Articles

- A Review on Discrepancy of ABO Blood Grouping, Distribution of Causes in Iran and the World, and Resolving Methods ..... 1796  
 Narges Seyfizadeh MSc, Nayer Seyfizadeh MSc, Majid Farshdusti-Hagh PhD

## Short Communication

- The Effect of Infectious Disease Specialists Deployment Plan on Using Antibiotics in Alzahra Hospital, Isfahan, Iran ..... 1804  
 Kamyar Mostafavizadeh MD, Behrouz Ataei MD, Roya Azad, Omid Pirhaji, Ali Mehrabi Koushki MSc, Hamidreza Sadeghian



## مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۳۰۶)، هفتمه سوم آذر ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

---

**امور نشر:**  
(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)  
**شرکت فرزانتگان راداندیش**  
اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵  
**تلفن و دورنگار:** ۰۳۱۱-۶۶۸۶۳۰۲  
f.radandish@gmail.com  
www.farzaneganco.ir  
تیراژ: ۵۰۰ نسخه

---

**ناشر:**  
انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان  
**نشانی:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان  
E-mail: publications@mui.ac.ir  
**دفتر مجله:** دانشکده پزشکی  
صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶  
مسؤول دفتر: گلناز رجبی  
**تلفن:** ۰۳۱۱-۶۶۹۴۷۳۷      **دورنگار:** ۰۳۱۱-۷۹۲۲۲۹۱  
E-mail: jims@med.mui.ac.ir  
**وب سایت مجله:** http://www.journals.mui.ac.ir/jims

---

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

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

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

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

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

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

## راهنمای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

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

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

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

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

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

#### **اگر منبع مورد نظر مقاله است:**

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

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

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

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

#### **اگر منبع مورد نظر کتاب است:**

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

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

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

#### **اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:**

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

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

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

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

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

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

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

## فهرست مطالب

### مقاله‌های پژوهشی

۱۷۴۶..... بررسی بیان نسبی ۱۰۳-miR در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مدل رت مبتلا به دیابت نوع ۲ و پیش دیابت.....  
نسیمه وطن دوست، صدیقه مؤمن‌زاده، سارا کمالی، دکتر رسول صالحی

۱۷۵۷..... اختلال در مسیر پیام‌رسانی Wnt از طریق متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد در زمان تشخیص بیماری.....  
علی قاسمی، دکتر محسن محمدی، عباس قوطاسلو، کاظم غفاری، صادق عباسیان

۱۷۶۷..... بررسی نتایج حاصل از درمان توسط تکنیک‌های کمک باروری در بیمارستان شهید بهشتی اصفهان.....  
دکتر روشنک ابوترابی، دکتر ویدا رضوی، شکوفه بقازاده، لاله شارق، فاطمه‌سادات مصطفوی

### مقاله مروری

۱۷۸۲..... مروری بر علل مغایرت گروه‌بندی مستقیم و معکوس سیستم ABO، توزیع فراوانی این عوامل در ایران و جهان و راهکارهای مرتفع‌سازی.....  
نرگس سیفی‌زاده، نیر سیفی‌زاده، دکتر مجید فرش‌دوستی حق

### مقاله کوتاه

۱۷۹۷..... بررسی توزیع فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی مرکز آموزشی- درمانی الزهرا (س) در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی در بیمارستان.....  
دکتر کامیار مصطفوی‌زاده، دکتر بهروز عطایی، رویا آزاد، امید پیرحاجی، علی مهرابی کوشکی، حمیدرضا صادقیان

## بررسی بیان نسبی miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مدل رت مبتلا به دیابت نوع ۲ و پیش دیابت

نسیمه وطن دوست<sup>۱</sup>، صدیقه مؤمن زاده<sup>۲</sup>، سارا کمالی<sup>۳</sup>، دکتر رسول صالحی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** دیابت نوع ۲ شایع‌ترین بیماری متابولیکی مزمن است که نرخ شیوع آن به سرعت در حال افزایش است و تعداد افراد زیادی را مبتلا می‌کند. علت این بیماری، ناشناخته است و گفته می‌شود برهمکنش عوامل ژنتیک، اپیژنتیک و محیطی از جمله چاقی مستعد کننده‌ی ابتلا به بیماری دیابت نوع ۲ هستند. miRNA به عنوان یکی از عوامل کلیدی در تنظیم بیان ژن با مهار ترجمه و یا تجزیه‌ی mRNA عمل می‌کند و این احتمال وجود دارد که miRNA در رخدادهای مقاومت انسولین و دیابت نوع ۲ نقش داشته باشند. یافته‌های جدید استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را به عنوان منعکس کننده‌ی وضعیت پاتولوژیک بافت‌ها معرفی کرده‌اند که می‌تواند منبع مناسبی جهت مطالعات و تشخیص‌های مولکولی در بیماری‌ها همچون بیماری دیابت نوع ۲ باشد. از جمله miRNAهای دخیل در مراحل مختلف دیابت نوع ۲، به خصوص مقاومت انسولین به عنوان اولین و مهم‌ترین عامل خطر دیابت نوع ۲، miR-103 می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی بیان نسبی miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی رت‌های مبتلا به دیابت القا شده به واسطه‌ی رژیم غذایی چرب/تزریق Streptozotocin در دو مرحله‌ی پیش دیابت و دیابت و مقایسه‌ی آن با رت‌های سالم بود.

**روش‌ها:** مدل حیوانی دیابت نوع ۲ با استفاده از ترکیب رژیم غذایی با چربی بالا و تزریق دوز پایین Streptozotocin (۳۵ mg/kg) ایجاد شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی رت‌های مبتلا در دو مرحله‌ی پیش دیابت (قبل از تزریق Streptozotocin) و دیابت (پس از تزریق) و همچنین رت‌های سالم جداسازی شد. RNA با استفاده از Trizol از سلول‌ها استخراج و سپس به cDNA (Complementary DNA) تبدیل شد. سطح بیان miR-103 به وسیله‌ی تکنیک qRT-PCR (Quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction) و حضور معرف SYBR Green و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی rno-miR-103 LNA TM Primerset سنجیده شد.

**یافته‌ها:** ترکیب رژیم غذایی چرب همراه با تزریق دوز پایین STZ می‌تواند دیابت نوع ۲ را به خوبی در رت‌ها القا کند. میانگین بیان rno-miR-103 در رت‌ها در مرحله‌ی دیابت و پیش دیابت نسبت به رت‌های سالم تفاوت معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های پژوهش حاضر، اهمیت miR-103 را در پاتوژنز دیابت نوع ۲ به خصوص در مراحل اولیه نشان می‌دهد و همچنین امکان مناسب بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را به عنوان یک منبع در دسترس و غیر تهاجمی در مطالعات و یا تشخیص‌های مولکولی برای پیش‌بینی و پیگیری شرایط بیماری دیابت فراهم می‌کند.

**واژگان کلیدی:** دیابت نوع ۲، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، تشخیص غیر تهاجمی، miR-103, microRNA

**ارجاع:** وطن دوست نسیمه، مؤمن‌زاده صدیقه، کمالی سارا، صالحی رسول. بررسی بیان نسبی miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای

خون محیطی مدل رت مبتلا به دیابت نوع ۲ و پیش دیابت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۶): ۱۷۵۶-۱۷۴۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشیار، گروه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران



## مقدمه

دیابت شایع‌ترین اختلال متابولیکی است که در اثر نقص در تولید، ترشح یا عملکرد انسولین به وجود می‌آید. تعداد افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ در جهان در طول سه دهه‌ی اخیر در حدود ۲ برابر افزایش یافته است. بر اساس گزارش‌ها، این رقم در سال ۲۰۱۱ به ۳۶۶ میلیون نفر رسیده است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ به ۵۲۲ میلیون نفر نیز افزایش یابد (۱). نقص در عملکرد انسولین (ناتوانی در بافت هدف در پاسخ به غلظت انسولین خون)، ابتدایی‌ترین و معمول‌ترین علت ایجاد دیابت تیپ ۲ است و کاهش ترشح انسولین پانکراس نقص نسبی در عملکرد ایجاد می‌کند و منجر به افزایش قند خون می‌گردد (۲-۳).

سطح بالای گلوکز خون با گذر زمان منجر به آسیب‌های شدید در چندین ارگان مختلف از جمله آسیب‌های کلیوی، رتینوپاتی، نابینایی، آسیب‌های عصبی و عروقی می‌گردد (۴). علاوه بر این، طولانی بودن مراقبت‌های پزشکی بدون درمان قطعی، این بیماری را به معضل بزرگ اقتصادی در سراسر جهان تبدیل ساخته است. اقدامات پیشگیرانه و تشخیص زودهنگام در صورت وجود یک نشانگر زیستی مناسب با سطوح قابل ردیابی قبل از ایجاد علائم، می‌تواند راه حلی جایگزین در این بیماری باشد.

علل ایجاد دیابت نوع ۲، مجموعه‌ای پیچیده از عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی و همچنین تأثیرات محیطی است (۵). در سال‌های اخیر، مطالعاتی برای شناسایی اجزایی با نقش اساسی در شروع و پیشرفت دیابت طراحی شده‌اند (۶). مطالعاتی بر اساس پروتئین و بیان ژن برای مشخص شدن روند و یا

نقص در مسیرهای سیگنال‌دهی در ایجاد بیماری دیابت استفاده شده است. اما مکانیسم مولکولی بیماری‌زایی دیابت هنوز مشخص نیست.

پس از کشف تنظیمات پس از رونویسی ژنوم، miRNA به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی کلیدی در بیان ژن معرفی شد که به احتمال در روند مقاومت انسولینی و ایجاد دیابت نوع ۲ نیز مؤثر است (۷-۸). miRNAها گروهی از RNAهای غیر کد شونده‌ی درون‌زاد با طول ۱۹-۲۲ نوکلئوتید هستند که توالی آن‌ها در بسیاری از گونه‌ها به صورت حفظ شده است (۹).

این اجزا با اتصال به ناحیه‌ی 3'UTR و در برخی موارد به 5'UTR و یا ناحیه‌ی کد شونده‌ی mRNA هدف، در تنظیم پس از رونویسی ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین‌ها دخالت دارند (۱۰). نحوه‌ی عملکرد این اجزا می‌تواند به وسیله‌ی تجزیه کردن نسخه‌ی رونویسی شده و یا مهار ترجمه‌ی آن به پروتئین باشد و این فرایند، به اتصال کامل یا نسبی بخش بنیادی miRNA (نوکلئوتیدهایی که برای اتصال miRNA به RNA الزامی است) با محل هدف، بستگی دارد (۱۱-۱۲).

با مشخص شدن خاصیت کلیدی تنظیمی miRNA در روندهای فیزیولوژی سلولی و نقش‌های متفاوت بیولوژیکی آن از جمله تمایز، تکثیر، مرگ سلولی، ترشح هورمون و غیره، این اجزا مورد هدف تحقیقات قرار گرفتند (۱۳). بروز تأثیر بیولوژیکی mRNA مستلزم ترجمه‌ی آن‌ها به پروتئین است. در حالی که miRNA می‌تواند واحد عملکردی مستقلی باشد (۱۴). علاوه بر miRNAهایی با هدف منفرد، برخی از آن‌ها می‌توانند گروهی از mRNAهای مرتبط را مورد هدف قرار دهند و از این جهت، تأثیر

ابزار ارتباطی متنوع که به سلول‌های دیگر انتقال می‌یابند، می‌توانند عملکردی مشابه در سلول‌های وارد شده داشته باشند (۲۶-۲۵). بر اساس این گزارش‌ها، می‌توان از miRNAهای خونی به منظور بررسی آثار دیابت استفاده کرد.

با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و اطلاعات موجود در مستندات پیشین، از بین miRNAهای دخیل در دیابت نوع ۲، miRNA با نقش کلیدی در مراحل مختلف دیابت از جمله مقاومت انسولین، گسترش چربی و چاقی و نقص ترشح انسولین در نظر گرفته شد (۳۰-۲۷). miR-103 در این مطالعه مورد هدف قرار گرفت و تغییرات پروفایل بیانی آن در سلول‌های گردش خون در سه گروه رت شامل گروه سالم، گروه پیش دیابت با رژیم غذایی پر چرب (HFD یا High fat diet) و گروه مبتلا به دیابت با القا از طریق STZ (Streptozotocin) و رژیم غذایی پر چرب بررسی شد.

### روش‌ها

۱۶ رت Wistar مذکر شش هفته‌ای با متوسط وزن  $150 \pm 5$  gr مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات بر اساس راهنمای نگهداری از حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در قفس‌های استاندارد (۳ عدد در هر قفس) و رطوبت کنترل شده با چرخه‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند.

همه‌ی رت‌ها رژیم غذایی طبیعی دریافت کردند. دیابت نوع ۲ (T2D یا Type 2 of Diabetes) طبق پروتکل Reed و همکاران و نیز Srinivasan و همکاران با تغییرات جزئی انجام گرفت (۳۲-۳۱). بعد از یک هفته نگهداری، برای تطابق حیوانات با

زیادی بر کنترل مسیرهای پیچیده‌ی متابولیکی و مؤثر در بیماری‌ها دارند (۱۵). بنابراین در اختلالات چند عاملی، پروفایل بیان یک ژن واحد بازتابی از یک شبکه‌ی گسترده است که حتی یک miRNA منفرد به دلیل عملکرد چندگانه‌ی آن می‌تواند علامتی اختصاصی و قطعی‌تری در مسیرهای پیچیده‌ی سیگنال‌دهی باشد (۱۶).

تغییر در بیان miRNA در بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های چند عاملی پیچیده مانند سرطان، آسیب‌های عصبی و بیماری‌های قلبی-عروقی مشاهده شده است (۱۷). گزارش‌های اخیر نشان داده است که miRNA می‌تواند نقش مهمی در ایجاد بیماری دیابت نوع ۲ از جمله عدم حساسیت به انسولین، تولید انسولین و ترشح آن، چاقی و در معنای گسترده‌تر هموستاز گلوکز و لیپید واضح است. گزارش‌های موجود به خوبی نظریه‌ی پروفایل بیانی miRNA به عنوان نشانگر زیستی برای بررسی اولیه‌ی مراحل آغازین دیابت در بافت‌های مرتبط با دیابت مانند پانکراس، کبد و ماهیچه‌ی اسکلتی و بافت چربی را تأیید می‌کند (۲۲-۱۸). اگر چه مانع مهم در استفاده از این گونه نشانگرهای تشخیصی و غربالگری اولیه، ماهیت تهاجمی و سخت در نمونه‌گیری است که با روند تهیه‌ی بیوپسی همراه است. خون به عنوان نماینده‌ی بافتی معرفی شده است که در تماس مداوم و نزدیک با ارگان‌های مختلف، بازتابی از تغییرات در این ارگان‌ها است و نسخه‌های RNA گردش خون، حوادث فیزیولوژیک و پاتولوژیک در بافت‌های مختلف بدن را به نمایش می‌گذارد (۲۵-۲۳).

تصور می‌شود miRNAهای آزاد به عنوان یک

محلول ۲۰ درصد گلوکز (۲ gr/kg) دریافت کردند. بعد از آن، غلظت گلوکز خون در زمان‌های ۰،۳۰،۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تجویز گلوکز سنجیده شد. ۲/۵ ml از خون محیطی در تیوب‌های حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) تهیه و برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell یا PBMC) با استفاده از گرادیان چگالی (Ficoll-Hypaque- Sigma, St. Louis, MO) طبق پروتکل استاندارد آن جداسازی شد.

RNA تمام با استفاده از Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) و طبق پروتکل سازنده‌ی آن با اصلاحاتی استخراج شد. به طور خلاصه، ۱ ml Trizol به نمونه اضافه و سپس unisp ۶ به نمونه اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق ۲۰۰ ml کلروفرم به آن اضافه شد و در ۴ °C به مدت ۳ دقیقه انکوبه و سپس به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد. پس از آن در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه و در ۴ °C سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی RNA به تیوب جدید انتقال یافت و ۵۰۰ μl ایزوپروپانول به آن اضافه شد و در دمای ۷۰ °C- به مدت ۱ ساعت انکوبه شد و پس از آن دوباره در دمای ۴ °C به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و رسوب RNA دو بار در اتانول ۷۵ درصد شسته و در معرض هوا خشک شد و سپس در ۲۵ μl آب فاقد RNase حل گردید و در دمای ۸۰ °C- نگهداری شد. خلوص RNA جداسازی شده در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm با دستگاه نانودراپ (Thermo scientific, ND-۱۰۰۰ Worcester, MA) سنجیده شد و کیفیت

محیط جدید، ۱۶ رت به صورت تصادفی به ۲ گروه تقسیم شدند. یک گروه رژیم غذایی طبیعی (NFD یا Normal fat diet) متشکل از ۶۶ درصد کربوهیدرات، ۲۲ درصد پروتئین و ۱۲ درصد چربی دریافت کردند و گروه دیگر، رژیم غذایی پر چرب شامل ۱۵ درصد کربوهیدرات، ۲۵ درصد پروتئین و ۶۰ درصد چربی دریافت کردند. بعد از ۱۰ هفته رت‌ها وزن شدند و گلوکز ناشتا و سطح انسولین، کلسترول و تری گلیسیرید خون سنجیده شد. دوز پایینی از STZ (۳۵ mg/kg) در محلول سیترات (pH = ۴/۴) به صورت درون صفاقی به رت در حالت ناشتا تزریق شد و گروه شاهد تنها بافر را دریافت کردند. رژیم غذایی ویژه‌ی دو گروه به مدت ۲ هفته ادامه یافت. گلوکز خون در حالت ناشتا و غیر ناشتا روزانه سنجیده شد. پروتکل مرکب از رژیم غذایی با چربی بالا و دوز پایین STZ، برای بروز علائم نزدیک به علائم دیابت نوع ۲ استفاده شد.

سطح گلوکز خون با استفاده از گلوکومتر اندازه‌گیری شد. سطح انسولین سرم با استفاده از کیت Mercodia rat insulin ELISA، تری گلیسیرید با استفاده از کیت Triglycerides LS (GPO-PAP) CO: Ziestchem diagnostics IR (Low density lipoprotein) LDL Enzimatic (Sensitivity: ۱ mg/dl, Expected value: < ۱۳۰/d Photometric parsazmun از خون لخته در سانتریفیوژ ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد.

برای آزمایش تحمل گلوکز خوراکی (OGTT یا Oral glucose tolerance test)، حیوانات پس از یک شب (۱۲ ساعت) عدم دریافت غذا به صورت گاوآژ

میانگین استاندارد ارائه شده‌اند. اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از Student t test یا One-way ANOVA (One-way analysis of variance) با Post hot multiple comparison سنجیده شدند. آنالیز آماری با استفاده از نسخه‌ی ۲۰ از نرم‌افزار SPSS (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام و  $P < 0/050$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### لقای دیابت تیپ در رت نر گونه‌ی Wistar

ترکیب رژیم غذایی پر چرب و دوز پایین STZ که به طور نزدیک وقایع طبیعی را از مقاومت انسولینی تا عدم عملکرد سلول‌های  $\beta$  تقلید می‌کند، برای ایجاد دیابت نوع ۲ در رت‌ها استفاده می‌شود و به طور مؤثر می‌تواند دیابت نوع ۲ را ایجاد نماید. تأثیر درمان بر وزن، غلظت گلوکز، انسولین، کلسترول و تری‌گلیسرید در جدول ۱ آمده است. این نتایج نشان می‌دهد که وزن رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی چربی بالا به طور تقریبی نسبت به رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی رژیم طبیعی (NFD) ۲۰ gr بیشتر بوده است. اگر چه کلسترول و LDL سرم دو گروه، تفاوت معنی‌داری ندارند، اما رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی چربی بیشتر، میزان تری‌گلیسرید و قند خون ناشتای بالاتری نشان می‌دهند (۵/۸۳ mmol/l). در این رت‌ها، سطح انسولین کاهش یافت؛ اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

شکل ۱ سطح گلوکز سرم خون بعد از OGTT را نشان می‌دهد. رت‌های گروه دریافت‌کننده‌ی رژیم غذایی طبیعی، افزایشی در غلظت گلوکز سرم در

آن با الکتروفورز روی ژل ۱ درصد آگارز بررسی شد. همه‌ی miRNAها به مولکول‌های پلی‌آدنیله تغییر یافتند و با استفاده از کیت سنتز cDNA (Exiqon's miRCURY LNA<sup>TM</sup>, Cat# ۲۰۳۳۰۰) در یک مرحله به cDNA تبدیل شدند. دم پلی A به miRNA بالغ اضافه شد و سنتز cDNA با استفاده از پرایمر پلی T با انتهای ۳' تغییر یافت و یک Universal tag ناحیه‌ی ۵' انجام گرفت. نسخه‌ی cDNA با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی miRNA و LNA-enhanced رفت و برگشت تکثیر شد. غلظت یکسانی از RNA استخراج شده (۲۰۰ ng) در واکنش cDNA با حجم کلی ۲۰  $\mu$ l استفاده شد (طبیعی‌سازی به وسیله‌ی مقدار).

بیان miRNA به وسیله‌ی real time SYBR-green I با استفاده از (Cat # ۲۰۳۴۵۰, Exiqon SYBR Green Master Mix) سنجیده شد. مخلوط واکنش PCR (۱۰  $\mu$ l) شامل ۴  $\mu$ l محصول رونویسی معکوس (۱:۱۰) برای تکثیر محصول RT (Real time) با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی LNA q-PCR بر ۱۰۳-miRNA-rno استفاده شد. PCR با استفاده از دستگاه Step one plus applied biosystems انجام گرفت؛ به صورتی که ابتدا ۱۰ دقیقه در  $95^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد و سپس در  $40^{\circ}\text{C}$  چرخه‌ی  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ ثانیه و  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه قرار گرفت. همه‌ی نمونه‌ها به صورت جفت تکثیر شدند. نتایج با استفاده از روش  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Delta delta CT Method) مقایسه‌ای بررسی شدند. Unisp 6 RNA spik in برای طبیعی‌سازی داده‌های q-PCR استفاده شد (۳۳-۳۴).

همه‌ی اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از

جدول ۱. متابولیت‌های خونی رت‌های شاهد و پیش دیابت که با رژیم غذایی پر چرب ایجاد شده‌اند

متغیر	بعد از مداخله‌ی رژیم غذایی (۱۰ هفته)		قبل از مداخله‌ی رژیم غذایی	
	مورد (HFD)	شاهد (NFD)	مورد (HFD)	شاهد (NFD)
وزن (gr)	223/50 ± 3/20	191/60 ± 6/51	145/75 ± 1/99	144/75 ± 3/06
TC (mmol/l)	1/55 ± 0/09	1/53 ± 0/13	+1/50 ± 0/13	1/51 ± 0/08
TG (mmol/l)	2/14 ± 0/29	+1/18 ± 0/10	1/23 ± 0/16	0/88 ± 0/08
LDL (mmol/l)	0/88 ± 3/7	0/91 ± 0/33	0/90 ± 0/34	0/90 ± 0/36
FBG (mmol/l)	5/83 ± 0/10	5/34 ± 0/43	4/91 ± 0/28	5/05 ± 0/17
انسولین (ug/l)	0/50 ± 0/03	1/30 ± 0/02	1/40 ± 0/10	1/20 ± 0/10

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند، n = 8 برای هر گروه، n = 6 برای انسولین، P ≤ 0/05 به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد

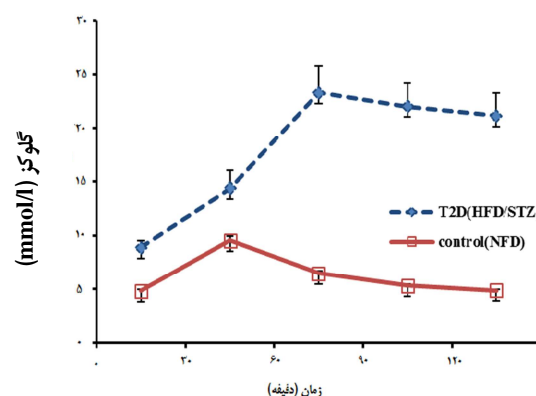
NFD: Normal fat diet; HFD: High fat diet; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; LDL: Low density lipoprotein  
FBG: Fast blood glucose

مدت ۳۰ دقیقه (۹/۵ mmol/l) بعد از دریافت گلوکز را نشان می‌دهند که بعد از ۲ ساعت به سرعت به سطح طبیعی می‌رسد (۵ mmol/l). بر عکس، غلظت گلوکز سرم در رت‌های دریافت کننده‌ی رژیم غذایی پر چرب به سرعت افزایش می‌یابد و حتی دو ساعت پس از دریافت گلوکز هم بالا باقی می‌ماند (۲۱ mmol/l).

تحمل گلوکز حیوانات با رژیم غذایی پر چرب که STZ دریافت کرده‌اند، در پی تغییرات گلوکز نقص نشان می‌دهد. سطح گلوکز بالای خون به طور مشخص در گروه HFD/STZ مشاهده شد. گلوکز خون ناشتا در حیوانات HFD/STZ به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده‌ی رژیم غذایی طبیعی و گروه دریافت کننده‌ی رژیم غذایی پر چرب بالاتر است. این سطح بین ۹/۵-۱۱ mmol/l و میانگین گلوکز خون گروه طبیعی ≤ ۱۹ mmol/l بود.

### بیان miR-103 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

سنجش‌ها به طور موفقیت‌آمیزی در نمونه‌های PBMC ۸ رت گروه NFD، ۸ رت گروه HFD و ۸ رت مدل مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام گرفت. miR-103 در نمونه‌های PBMC سه گروه قابل ردیابی بود و همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، بیان miR-103 در نمونه‌های PBMC پیش دیابت (HFD) و رت‌های مدل مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه طبیعی افزایش یافته است (به



شکل ۱. آزمایش تحمل گلوکز (OGTT) یا Oral glucose tolerance test در رت‌های گروه NFD (Normal fat diet) و HFD/STZ

(High fat diet/ Streptozotocin). مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند، n = 8 برای هر گروه P ≤ 0/05 به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد

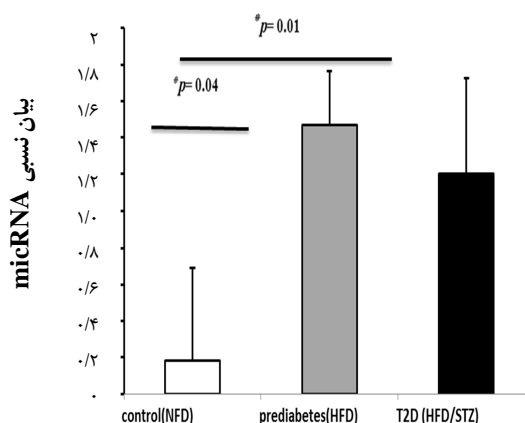
بافت چربی، پانکراس و ماهیچه‌ی اسکلتی متمرکز هستند. جمع‌آوری این بافت‌ها برای تشخیص‌های ژنتیکی دشوار است و شواهد بر وجود miRNA در خون انسان و حیوانات (علاوه بر بافت) دلالت می‌کنند که این miRNA می‌توانند به صورت آزاد در خون و یا درون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی قرار بگیرند (۳۶-۳۷).

برخی انواع ارتباطات درون ارگانی با مبادله‌ی miRNA از ارگان‌های مختلف به ویژه اعضای با اختلال فیزیولوژیکی به خون همراه است و آن را منبع مناسب و غیر تهاجمی جایگزین برای چنین ارگان‌هایی می‌سازد (۳۸).

یافته‌ها نشان می‌دهد که miRNA ترشحي آگزوزومی به عنوان خاموش کننده‌ی کلیدی بیان ژن عمل می‌کند و باعث مهار چند نسخه‌ای است که منجر به ایجاد حوادث بیولوژیکی ویژه می‌گردد. PBMCها در سراسر بدن گردش می‌کنند و در تماس نزدیک و مستقیم با ارگان‌های مختلف هستند که به عنوان منبع مهمی برای بیماری‌های همراه با تغییر بیان miRNA به شمار می‌روند. این واقعیت، روش نوینی برای بررسی سلامت افراد با بررسی miRNAهای گردش خون به وجود آورده است.

Zampetaki و همکاران اولین شواهد مبنی بر تغییر miRNAهای پلازما در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ را ارائه دادند (۳۹). الگوی متفاوت بیانی در miRNAهای در گردش مرتبط با دیابت در سرم و خون بیماران مبتلا و همچنین در حیوانات نشان داده شده است. نتایج به دست آمده، مکمل نتایج حاصل از پانکراس و دیگر بافت‌های هدف انسولین است (۴۰-۴۱). اطلاعات کافی در مورد الگوی بیانی

ترتیب با  $P = 0.024$  و  $P = 0.010$ . اختلاف معنی‌داری بین سطح miR-103 در نمونه‌های PBMC بین رت‌های گروه HFD و رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ مشاهده نشد ( $P = 0.250$ ) (شکل ۲).



شکل ۲. آنالیز بیان miRNA به وسیله‌ی qRT-PCR (Quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reaction) در سلول‌های تک هسته‌ای خون ( $n_{pre} = 8$ ,  $n_{T2D} = 8$ ,  $n_{NFD} = 8$ , diabetes). مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در مقیاس  $\log_2$  بیان شده است.  $P < 0.050$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) استفاده گردید.

## بحث

شناسایی نقص مولکولی اولیه‌ی دخیل در پاتوفیزیولوژی دیابت، هدف علمی و بالینی مهمی است. مطالعات پیشین، ارتباط بین تغییر بیان miRNA و گسترش دیابت نوع ۲ را نشان داده‌اند (۳۵). نقش واسطه‌ای پیشنهاد شده برای این مولکول‌های کوچک در دیابت نوع ۲، پنجره‌ی جدیدی به سوی تحقیق و آشکار ساختن نشانگرهای زیستی منتخب در دیابت نوع ۲ گشوده است. این مطالعات، به طور عمده بر بیان miRNA در بافت‌های مرتبط با دیابت مانند کبد،

دقیق‌تری به هم ریختگی متابولیکی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ را نسبت به مدل‌های جوندگان تک ژنی دیابت/چاقی یا چاقی ایجاد شده با رژیم غذایی در رت و موش نشان می‌دهد.

ایجاد مدل‌های حیوانی مبتلا به دیابت نوع ۲ با رژیم غذایی پر چرب با کربوهیدرات پایین و در پی آن تزریق STZ انجام گرفت. مدل‌های حیوانی که به این روش ایجاد می‌شوند، قبل از تزریق STZ افزایش انسولین خون را نشان می‌دهند. اگر چه در این مطالعه، دوره‌ی طولانی‌تری تحت رژیم پر چرب قرار گرفتند تا مدل نزدیک‌تری به نقص تحمل گلوکز انسانی (IFG/IGT یا Impaired fasting glucose/impaired glucose tolerance) ایجاد شود.

بر اساس برخی گزارش‌ها، مسیر انتخابی در این مطالعه مناسب‌ترین روش برای تقلید وضعیت پیش دیابت در انسان است. این روش، با تفکر شکل‌گیری حالت مقاومت انسولینی سال‌ها بعد از ایجاد دیابت و عدم عملکرد سلول‌های  $\beta$  همخوانی دارد. با در نظر گرفتن گزارش‌های دیگر که گروهی از miRNAهای مبتلا به دیابت را بررسی نموده‌اند و تغییر مشخصی مشاهده نشد (۲۱)، مطالعه بر روی miR-103 نشان از اهمیت آن در بیماری‌زایی دیابت دارد و می‌تواند در برنامه‌های غربالگری اولیه استفاده شود.

### تشکر و قدردانی

به این وسیله از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

micRNAهای سلول‌های خونی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ که یک نمونه‌ی قابل دسترسی برای تشخیص‌های کلینیکی است، وجود ندارد (۴۲).

در این مطالعه بر اساس سنجش‌های *in silico* و اطلاعات موجود از پایگاه اینترنتی و منابع علمی منتشر شده‌ی مناسب، روی الگوی بیانی miR-103 در نمونه‌های PBMC رت‌های شاهد (NFD)، پیش دیابت (HFD) و مبتلا به دیابت نوع ۲ متمرکز است. miR-103 نقش کلیدی در مراحل مختلف ایجاد دیابت نوع ۲ ایفا می‌کند. نقش miR-103 در تنظیم چندین mRNA دخیل در مراحل متابولیسم لیپیدی و Acetyl-coA سلولی پیچیده است (۳۰). خاموش کردن miR-103 در موش‌های ob/ob منجر به افزایش حساسیت بافت چربی به انسولین می‌شود. ژن Caveolin1 که یکی از اجزای کلیدی Caveolae است و از واسطه‌های مهم در سیگنال انسولین است، به عنوان یکی از هدف‌های تأیید شده‌ی آزمایشگاهی miR-103 معرفی شده است (۴۳).

همچنین گزارش شده است که miR-103 در کبد موش‌های ob/ob در مقایسه با گروه طبیعی و موش‌های تیمار شده با STZ، افزایش بیان قابل توجهی نشان می‌دهد (۴۴).

در این مطالعه، رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ که با القای HFD/STZ ایجاد شدند، برای کنترل تغییرات rno-miR-103 پس از دریافت رژیم غذایی پر کالری قبل از تزریق STZ به منظور دستیابی به فهم بیشتری از مرحله‌ی تغییر بیان rno-miR-103 از وضعیت پیش دیابت به دیابت استفاده شد. HFD/STZ به طور



## References

- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94(3): 311-21.
- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathophysiology of prediabetes. *Curr Diab Rep* 2009; 9(3): 193-9.
- Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(3): 193-205.
- Schlienger JL. Type 2 diabetes complications. *Presse Med* 2013; 42(5): 839-48.
- Sanghera DK, Blackett PR. Type 2 Diabetes Genetics: Beyond GWAS. *J Diabetes Metab* 2012; 3(198).
- Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 1998; 19(4): 491-503.
- Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, Datta M. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem* 2009; 23(4-6): 221-32.
- Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovasc Res* 2012; 93(4): 583-93.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005; 434(7031): 338-45.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E. MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 523-30.
- Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 2006; 25(46): 6163-9.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett* 2005; 579(26): 5830-40.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- van Iterson M, Bervoets S, de Meijer EJ, Buermans HP, 't Hoen PA, Menezes RX, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression: adding biological significance to microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(15): e146.
- Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Immune Netw* 2011; 11(3): 135-54.
- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432(7014): 226-30.
- Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 2009; 15(2): 287-93.
- He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2007; 21(11): 2785-94.
- Ling HY, Ou HS, Feng SD, Zhang XY, Tuo QH, Chen LX, et al. Changes IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(9): e32-e39.
- Rottiers V, Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Gurumurthy S, Zhong L, Li Y, et al. MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 76: 225-33.
- Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3): 792-7.
- Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpfennig F, Scheffler M, et al. miRNAs in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer* 2009; 9: 353.
- Zeng XL, Zhang SY, Zheng JF, Yuan H, Wang Y. Altered miR-143 and miR-150 expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(23): 4510-6.
- Mohr S, Liew CC. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. *Trends Mol Med* 2007; 13(10): 422-32.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004; 2(11): e363.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines,



- indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1): 15-20.
29. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 2011; 44(5): 839-47.
  30. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 2007; 91(3): 209-17.
  31. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000; 49(11): 1390-4.
  32. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005; 52(4): 313-20.
  33. Roberts TC, Coenen-Stass AM, Wood MJ. Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine serum. *PLoS One* 2014; 9(2): e89237.
  34. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50(4): 298-301.
  35. Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Wills QF, Kaisaki PJ, Barrett A, et al. MicroRNA-125a is over-expressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of Type 2 Diabetes. *BMC Med Genomics* 2009; 2: 54.
  36. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18(10): 997-1006.
  37. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3(11): e3694.
  38. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010; 285(23): 17442-52.
  39. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107(6): 810-7.
  40. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6(8): e22839.
  41. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011; 48(1): 61-9.
  42. Collares CV, Evangelista AF, Xavier DJ, Rassi DM, Arns T, Foss-Freitas MC, et al. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Res Notes* 2013; 6: 491.
  43. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011; 474(7353): 649-53.
  44. Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, et al. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res* 2009; 50(9): 1756-65.

## Evaluation of miR-103 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 2 Diabetic and Prediabetic Rats

Nasimeh Vatandoust<sup>1</sup>, Sedigheh Momenzadeh MSc<sup>2</sup>, Sara Kamali<sup>3</sup>, Rasoul Salehi PhD<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Type 2 diabetes (T2D) is the most prevalent chronic metabolic disease. MicroRNAs act as regulators of gene expression by inhibiting translation or promoting degradation of target mRNAs. Recent reports indicate that microRNAs can play important role in establishment of diabetes and has roles in type 2 diabetes different aspects including insulin insensitivity. To detect a noninvasive screening method for type 2 diabetes, we evaluated the expression level of miR-103 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) samples from pre-diabetes and type 2 diabetes rats in compare to normal group (n = 8 in each group) using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

**Methods:** Animal model type 2 diabetes was made with combination of high-fat diet (HFD) and low dose of streptozotocin (STZ) injection. Blood glucose level, serum insulin, and cholesterol, low density lipid and triglyceride levels were measured after 10-weeks diet interference. Peripheral blood mononuclear cells isolated from blood samples of three groups of animals, and then total RNA was obtained using Trizol reagent. All microRNAs converted to cDNA (complementary DNA). Expression level of rno-miR-103 was assessed via one-step SYBR Green I relative real-time polymerase chain reaction, using specific LNA TM qRT-PCR primer set for amplifying rno-miR-103. Statistical analysis was performed using SPSS<sub>20</sub> software.

**Findings:** Combination of high-fat diet and low dose of streptozotocin effectively induced type 2 diabetes in rats. rno-miR-103 expression level in peripheral blood mononuclear cells samples of pre-diabetic (high-fat diet) subjects and type 2 diabetes rats significantly elevated in compare to normal group.

**Conclusion:** The high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes animal model is the most suitable way for mimicking pre-diabetes and diabetes in men. The result of miRNA expression assay in peripheral blood mononuclear cells indicates the importance of rno-miR-103 in type 2 diabetes pathogenesis in early stages and has potential as a clinically useful noninvasive source to predict the disease status.

**Keywords:** Type 2 diabetes, MicroRNA, Noninvasive diagnosis, Peripheral blood mononuclear cells, miR-103

**Citation:** Vatandoust N, Momenzadeh S, Kamali S, Salehi R. **Evaluation of miR-103 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 2 Diabetic and Prediabetic Rats.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(306): 1746-56

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Rasoul Salehi PhD, Email: r\_salehi@med.mui.ac.ir

## اختلال در مسیر پیام‌رسانی Wnt از طریق متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد در زمان تشخیص بیماری

علی قاسمی<sup>۱</sup>، دکتر محسن محمدی<sup>۲</sup>، عباس قوطاسلو<sup>۱</sup>، کاظم غفاری<sup>۳</sup>، صادق عباسیان<sup>۱</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** لوسمی میلوئیدی حاد (AML یا Acute myeloid leukemia) گروه هتروژنی از بدخیمی‌های هماتولوژیک می‌باشند که عوامل زیادی در پاتوژنز آن‌ها دخیل هستند. در AML، تعداد زیادی از ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور مثل CDKN2B و p73 طی فرایند DNA متیلاسیون خاموش می‌شوند. پروتئین‌های WIF1 (Wnt inhibitory factor1) و DKK1 (Dickkopf1)، تنظیم‌کننده‌های منفی مسیر پیام‌رسانی Wnt می‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به AML مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** نمونه‌ی خون ۱۲۰ بیمار مبتلا به AML و ۳۰ فرد سالم به عنوان شاهد گرفته شد. DNA نمونه‌ها استخراج و با سدیم بی‌سولفید تیمار دارویی گردید. برای بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌ها، از تکنیک MSP (Methylation specific-polymerase chain reaction) با پرایمرهای اختصاصی برای توالی متیله و غیر متیله‌ی ژن‌های WIF1 و DKK1 استفاده شد.

**یافته‌ها:** درصد هایپرمتیلاسیون برای ژن‌های WIF1 و DKK1 به ترتیب ۳۵/۰ (۴۲/۱۲۰) و ۲۸/۳ (۳۴/۱۲۰) بود. در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون این دو ژن مشاهده نشد. بیشترین هایپرمتیلاسیون ژن WIF1 ( $P = ۰/۰۰۳۰$ ) و ژن DKK1 ( $P = ۰/۰۰۵۰$ ) در بیماران با زیر گروه AML-M۰ مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد که همانند بسیاری از تومورهای توپر، متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در AML نیز اتفاق می‌افتد. از این رو احتمال می‌رود که متیلاسیون این ژن‌ها در شروع بیماری نقش داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** متیلاسیون DNA، Wnt inhibitory factor 1، Dickkopf1، لوسمی حاد میلو بلاستیک

**ارجاع:** قاسمی علی، محمدی محسن، قوطاسلو عباس، غفاری کاظم، عباسیان صادق. اختلال در مسیر پیام‌رسانی Wnt از طریق متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد در زمان تشخیص بیماری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۶): ۱۷۶۶-۱۷۵۷

خون‌ساز، توقف بلوغ سلول‌ها در مرحله‌ی بلاست و مهاجرت بلاست‌ها از مغز استخوان به خون محیطی همراه است (۱). در پاتوژنز AML برخی از ناهنجاری‌ها از جمله تغییرات اپی‌ژنتیک و جابه‌جایی

### مقدمه

لوسمی حاد میلوئیدی (Acute myeloid leukemia یا AML) اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌باشد که با تکثیر مهار نشدنی سلول‌های بنیادی

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

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- مربی، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

اولین بدخیمی هماتولوژیک که نقش مهم مسیر پیام‌رسانی Wnt در پاتوژنز آن مشاهده شد، لوسمی میلوییدی مزمن (Chronic myeloid leukemia یا CML) بود (۱۰). بتا کاتینین یک عامل رونویسی تنظیم کننده‌ی داخل سلولی است که با سرطان‌ها همراه است. Wnt سطح سیتوپلاسمی و پایداری بتا کاتینین را کنترل می‌کند (۱۱). در غیاب لیگاند Wnt و نقش محافظتی آن، سطح بتا کاتینین به دلیل تخریب توسط آنزیم‌های کازئین کیناز ۱ و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳، کاهش می‌یابد (۱۲). اما زمانی که لیگاند به گیرنده‌ی خود یعنی گیرنده‌ی فریزلد (Frizzled receptor) متصل شود، باعث فعال شدن پروتئین DV1 (Dishevelled) می‌گردد (۱۳). زمانی که پیام‌رسانی Wnt توسط پروتئین DKK1 سرکوب می‌شود، بتا کاتینین فسفریله می‌گردد و در پی آن، یوبی کوئینه و تجزیه می‌شود (۷).

تجمع سیتوپلاسمی بتا کاتینین منجر به انتقال آن به داخل هسته می‌شود و سبب بیان برخی از ژن‌های درگیر در تکثیر و تمایز سلولی می‌شود (۹، ۱۴). در سال‌های اخیر، مشاهده شده است که هر دو عامل تغییرات کروموزومی و جهش FLT3 مرتبط با پاتوژنز AML در مسیر پیام‌رسانی Wnt نیز دخیل می‌باشند (۱۵). متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 باعث کاهش اثر مهاری بر روی مسیر Wnt می‌شود. سطح سیتوپلاسمی و هسته‌ای بتا کاتینین باعث تقویت عوامل رونویسی می‌گردد که سبب بیان برخی از ژن‌های دخیل در تنظیم چرخه‌ی سلولی از جمله myc، cox و Cyclin D می‌گردد (۱۶). بنابراین متیلاسیون این ژن‌ها ممکن است نقش آغازگر در لوکموژنز AML را داشته باشد. در مطالعه‌ی حاضر،

کروموزومی مشخص شده است. پیشرفت‌های اخیر در تحقیقات گسترده‌ی مولکولی، کمک زیادی در چگونگی تشخیص AML می‌کند. در AML، تعداد زیادی از ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور مثل CDKN2B و p۷۳ توسط فرایند DNA متیلاسیون خاموش می‌شوند (۲). اختلالات اپی ژنتیکی در مقایسه با تغییرات ژنتیکی برگشت‌پذیر هستند و توسط عوامل دمتیله کننده‌ی DNA از جمله AZA و ۵-آزا-۲-داکسی سائتیدین که در درمان بدخیمی‌های خونی نقش دارند، درمان می‌شوند (۳-۶).

علاوه بر سن، شمارش گلبول‌های سفید و سیتوژنتیک، بررسی تغییرات ژنتیکی از جمله جهش ژن‌های NPM1 (نوکلئوفوسمین)، FLT3 و WT1 (Wilms tumor 1) نیز از جمله عوامل پیش‌آگهی دهنده‌ی مهم AML می‌باشند. در سال‌های اخیر، اختلالات اپی ژنتیکی شامل متیلاسیون ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور مانند ژن‌های WIF1 (Wnt inhibitory factor 1) و DKK1 (Dickkopf-1) نقش مهمی در پاتوژنز AML ایفا می‌کنند. این تغییرات، منجر به ممانعت از آپوپتوز و تمایز سلول‌های بلاست، افزایش تکثیر و خود نوسازی سلول‌های بلاست می‌شود (۷). پروتئین‌های WIF1 و DKK1 آنتاگونیست Wnt هستند که باعث سرکوب مسیر پیام‌رسانی Wnt در افراد سالم می‌شوند (۸). مسیر پیام‌رسانی Wnt در تمایز و تکثیر سلول‌ها نقش تنظیمی را بر عهده دارد. در برخی از بدخیمی‌ها از جمله سرطان کولورکتال، تومورهای سر و گردن و سرطان معده، بر اثر فعالیت مسیر پیام‌رسانی Wnt، تکثیر کنترل نشده‌ی سلول‌ها مشاهده شده است (۹).

وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص مورد بررسی قرار گرفت.

### روش‌ها

نمونه‌ی خون ۱۲۰ بیمار مبتلا به AML در زمان تشخیص و ۳۰ نمونه از افراد سالم به عنوان شاهد منفی گرفته شد. تمام بیماران توسط رده‌بندی FAB (French-American-British) گروه‌بندی شدند. شاخص‌های بالینی شامل شمارش گلبول سفید، پلاکت، سن، هموگلوبین و میزان بهبودی بعد از شیمی درمانی القایی، از پرونده‌های پزشکی بیماران استخراج گردید. سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه‌های گرفته شده شامل سلول‌های بلاست لوسمیک با روش سدیممتاسیون گرادیان غلظت با استفاده از محلول Ficoll-hypaque جدا و در ادامه، DNA با روش استاندارد نمک اشباع تخلیص شد (۱۷).

در مرحله‌ی بعد، DNA استخراج شده به وسیله‌ی کیت (Epitect Bisulfite kit, Qiagen) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شد. بعد از تیمار، بازهای سیتوزین غیر متیله به باز اوراسیل تبدیل می‌شوند، در حالی که بازهای سیتوزین متیله دست نخورده باقی می‌مانند. سپس وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با استفاده از تکنیک MSP (Methylation specific polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت. MSP یک نوع PCR است که به بررسی متیلاسیون جزایر CpG می‌پردازد.

در این روش، از ۲ جفت پرایمر اختصاصی برای بررسی توالی متیله و غیر متیله استفاده شد. توالی‌های پرایمر اختصاصی که برای ژن DKK1 متیله استفاده

شد، شامل پرایمر مستقیم با توالی ۳'-CGGAATGTTTCGGGTTTCGC-۵' و پرایمر معکوس ۳'-CACGAAACCGTACCGATTTCG-۵' و برای ژن DKK1 غیر متیله پرایمر مستقیم با توالی ۳'-GTTGGAATGTTTTGGGTTTGT-۵' و پرایمر معکوس ۳'-CCACAAAACCATAACCAATTCA-۵' بود. توالی‌های پرایمر اختصاصی که برای ژن WIF1 متیله استفاده شد، شامل پرایمر مستقیم با توالی ۳'-ATTTAGGTCGGGAGGCGACGC-۵' و پرایمر معکوس ۳'-GACCTCCGCCCGCAATACCAA-۵' و برای ژن DKK1 غیر متیله پرایمر مستقیم با توالی ۳'-TGGTATTTAGGTTGGGAGGTGATGT-۵' و پرایمر معکوس ۳'-AACCTCCACCCACAATACCAA-۵' بود.

در واکنش MSP برای هر بیمار، ۴ واکنش با پرایمرهای متیله و غیر متیله مرتبط با ژن‌های WIF1 و DKK1 مورد بررسی قرار گرفت. برای وضعیت متیله از ۲ μl DNA که از قبل با بی‌سولفیت مجاور گشته بود، ۴ μl DH<sub>2</sub>O، ۱۲ μl Master mix، ۰/۵ μl پرایمر Forward و ۰/۵ μl پرایمر Reverse استفاده شد. در حالی که برای بررسی وضعیت غیر متیله، از ۲ μl DNA، ۷/۵ μl DH<sub>2</sub>O، ۱۲ μl Master mix، ۰/۵ μl پرایمر Forward، ۰/۵ μl پرایمر Reverse و ۰/۵ μl MgCl<sub>2</sub> استفاده گردید. در ابتدا اجزای واکنش MSP تحت شرایط پیش دمایی که شامل ۹۹ °C به مدت ۱ دقیقه و ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه بود، قرار گرفت. سپس این واکنش توسط ۳۵ سیکل که شامل ۹۹ °C برای ۱۰ ثانیه، ۹۵ °C برای ۳۰ ثانیه،

(۳۸/۳ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند (شکل ۲). در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد منفی که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 مشاهده نشد. ارتباط بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با علایم آزمایشگاهی و بالینی بیماران در جدول ۱ آمده است.

P1		P2		P3		P4	
M	U	M	U	M	U	M	U



C1		C2		C3		C4		C5	
U	M	U	M	U	M	U	M	U	M



شکل ۱. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن WIF1 در تعدادی از بیماران AML (Acute myeloid leukemia) و نمونه‌های شاهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نمونه‌های افراد سالم به عنوان شاهد منفی با هیچ کدام از پرایمرهای متیله باند نداده است. شاهد مثبت = PC؛ شاهد منفی = NC؛ بیمار = P؛ متیله = M؛ غیر متیله = U

P1		P2		P3		P4	
U	M	U	M	U	M	U	M



C1		C2		C3		C4		C5	
M	U	M	U	M	U	M	U	M	U

شکل ۲. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن DKK1 در تعدادی از بیماران AML (Acute myeloid leukemia) و نمونه‌های شاهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نمونه‌های افراد سالم به عنوان شاهد منفی با هیچ کدام از پرایمرهای متیله باند نداده است. شاهد مثبت = PC؛ شاهد منفی = NC؛ بیمار = P؛ متیله = M؛ غیر متیله = U

۵۸ °C برای ۳۰ ثانیه (WIF1-UM Primer)، ۶۲ °C برای ۳۰ ثانیه (WIF1 and DKK1-M Primer) و ۷۰ °C برای ۵ دقیقه (Extension) بود، دنبال شد. در این مطالعه، از کیت تجاری EpiTect PCR (Qiagen Inc cat No.۵۹۶۹۵) که حاوی DNA غیر متیله و DNA متیله بود، به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت استفاده گردید. به منظور تأیید محصول MSP، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳ درصد انجام گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون‌های Fisher's exact و Mann-Whitney و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱، SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.  $P < 0/050$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

از ۱۲۰ بیمار مورد مطالعه، ۷۸ نفر (۶۵ درصد) مرد و ۴۲ نفر (۳۵ درصد) زن بودند. محدوده‌ی سنی بیماران بین ۱۵-۷۲ سال و میانگین سنی آن‌ها ۴۵ سال بود. شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به ترتیب ۱۴۵۰۰۰-۶۰۰۰ و ۲۸۰۰۰۰-۲۰۰۰۰ و میانگین آن‌ها به ترتیب ۲۷۸۱۸/۵ و ۹۸۶۳۳/۳ سلول در هر میکرولیتر بود.

برای ژن WIF1، ۴۵ مورد از بیماران (۳۷/۵ درصد) به صورت همی‌متیله، ۴۲ مورد (۳۵ درصد) به طور کامل متیله و ۳۷ مورد (۳۰/۸ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند (شکل ۱). در حالی که برای ژن DKK1، ۴۰ مورد (۳۳/۳ درصد) به صورت همی‌متیله، ۳۴ مورد (۲۸/۳ درصد) به طور کامل متیله و ۴۶ مورد



ژن WIF1 و ۳ بیمار (۸/۸۲ درصد) برای ژن DKK1 هایپرمتیله بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با عود بیماران مشاهده نشد (به ترتیب  $P = 0/149$  و  $P = 0/552$ ).

همچنین اطلاعات مربوط به شیمی درمانی ۱۰۹ بیمار (۹۰/۸ درصد) درمان شده موجود بود. از این تعداد، ۹۵ بیمار (۷۹/۱ درصد) پس از شیمی درمانی دچار بهبودی کامل شدند که از این تعداد، به ترتیب ۳۰ و ۲۴ بیمار برای ژن‌های WIF1 و DKK1 هایپرمتیله بودند (به ترتیب  $P = 0/143$  و  $P = 0/211$ ).

۳۳ بیمار (۲۷/۵ درصد) به شیمی درمانی القایی مقاوم بودند، که از این تعداد، به ترتیب ۱۴ و ۹ بیمار برای ژن‌های WIF1 و DKK1 هایپرمتیله بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بین بیماران با و بدون متیلاسیون و بهبودی کامل پس از شیمی درمانی مشاهده نگردید.

در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص فراوانی هایپرمتیلاسیون دو ژن WIF1 و DKK1 به ترتیب ۳۵ درصد (۴۲ نفر از ۱۲۰ بیمار) و ۲۸/۳ درصد (۳۴ نفر از ۱۲۰ بیمار) بود. همچنین ۲۹/۱ درصد بیماران (۳۵ نفر از ۱۲۰ بیمار) در زمان تشخیص برای ژن‌های WIF1 و DKK1 متیله بودند (جدول ۱).

متیلاسیون نابه‌جای این ژن‌ها در تمام زیر گروه‌های FAB-AML مشاهده شد. بیشترین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 ( $P = 0/003$ ) و DKK1 ( $P = 0/005$ ) در ارتباط با زیر گروه FAB-M۰ و AML-M مشاهده شد (جدول ۱). هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 با شاخص‌های بالینی بیماران شامل جنس، سن، شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت مشاهده نشد (جدول ۱). تعداد ۱۶ نفر از ۱۲۰ بیمار دچار عود شده بودند که از این بین، ۷ بیمار (۱۶/۶ درصد) برای

جدول ۱. ارتباط بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های WIF1 و DKK1 با علائم بالینی و آزمایشگاهی بیماران AML (Acute myeloid leukemia)

مقدار P	DKK1 (Dickkopf1)		مقدار P	WIF1 (Wnt inhibitory factor1)		خصوصیات
	غیر متیله	متیله		غیر متیله	متیله	
	۸۶ (۷۱/۶)	۳۴ (۲۸/۳)		۷۸ (۶۵)	۴۲ (۳۵)	تعداد بیماران (درصد)
۰/۷۸۱	۴۲/۵ (۱۷-۶۸)	۴۳ (۲۲-۶۴)	۰/۲۸۵	۳۹ (۱۸-۶۰)	۴۲/۵ (۲۲-۶۳)	متوسط سن (محدوده‌ی سنی)
۰/۵۷۷	۶۵	۲۵	۰/۲۱۷	۴۸	۳۰	جنس (درصد)
	۲۱	۹		۳۰	۱۲	مرد زن
۰/۲۰۱	۱۳/۲	۶۴/۱	۰/۲۷۸	۲۹/۶	۱۴/۵	میانگین شمارش گلبول‌های سفید ( $10^9/l$ )
۰/۳۸۸	۱۲۸	۹۱	۰/۶۹۴	۱۰۲	۱۱۵/۴	میانگین شمارش پلاکت ( $10^9/l$ )
۰/۱۸۵	۸/۹	۸/۳	۰/۲۸۰	۸/۷	۸/۳	میانگین طیف هموگلوبین (g/dl)
۰/۰۰۵	۳ (۳/۴)	۷ (۲۰/۵)	۰/۰۰۳	۲ (۲/۵)	۸ (۱۹/۰)	گروه‌بندی FAB، تعداد
۰/۹۹۹	۱۹ (۲۲)	۷ (۲۰/۵)	۰/۸۱۷	۱۶ (۲۰/۵)	۱۰ (۲۳/۸)	M۰ M۱ M۲ M۴ M۵ M۶ (درصد)
۰/۱۷۸	۲۶ (۳۰/۲)	۶ (۱۷/۶)	۰/۵۲۵	۲۲ (۲۸/۲)	۱۰ (۲۳/۸)	
۰/۳۰۳	۱۸ (۲۰/۹)	۴ (۱۱/۷)	۰/۴۶۶	۱۶ (۲۰/۵)	۶ (۱۴/۲)	
۰/۰۹۴	۱۶ (۱۸/۶)	۲ (۵/۸)	۰/۲۸۸	۱۴ (۱۷/۹)	۴ (۹/۵)	
۰/۵۰۶	۱۰ (۱۱/۶)	۲ (۵/۸)	۰/۵۳۸	۹ (۱۱/۵)	۳ (۷/۱)	
۰/۲۱۱	۷۱ (۸۲/۵)	۲۴ (۷۰/۵)	۰/۱۴۳	۶۵ (۸۳/۳)	۳۰ (۷۱/۴)	وضعیت بیماران، تعداد
۰/۹۹۹	۴ (۴/۶)	۱ (۲/۹)	۰/۱۳۷	۲ (۲/۵)	۳ (۷/۱)	بهبودی کامل مرگ (درصد)
۰/۵۵۲	۱۳ (۱۵/۱)	۳ (۸/۸)	۰/۱۴۹	۹ (۱۱/۵)	۷ (۱۶/۶)	عود

FAB: French-American-British

## بحث

مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin در بسیاری از فرایندها از جمله مورفولوژی، حرکت، تکثیر، تعیین سرنوشت سلول‌ها و تکامل ارگانل‌ها دخالت دارد. درک نقش مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز، باعث به وجود آمدن این فرضیه شده است که اختلال در این مسیر پیام‌رسانی، امکان دارد در پاتوژنز لوسمی‌ها نقش داشته باشد (۲۰-۱۸). WIF1 و DKK1 پروتئین‌های سرکوب‌کننده‌ی توموری هستند که تعدیل‌کننده‌ی مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin می‌باشند. این پروتئین‌ها با اتصال به پروتئین Wnt مانع از اتصال آن به گیرنده‌ی Wnt می‌شوند. در نتیجه، سبب غیر فعال شدن مسیر پیام‌رسانی Wnt می‌گردند. از این رو، ممکن است ارتباطی بین متیلاسیون ژن‌های آنتاگونیست مسیر پیام‌رسانی Wnt و فعال شدن این مسیر در تومورهای توپور و لوسمی‌ها وجود داشته باشد (۲۰-۱۹). متیلاسیون نابه‌جای ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور، یکی از اختصاصی‌ترین و رایج‌ترین حوادث ژنتیکی در اکثر سرطان‌های انسانی می‌باشد (۲۲-۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 به ترتیب با فراوانی ۳۵ درصد (۴۲ نفر از ۱۲۰ بیمار) و ۲۸/۳ درصد (۳۴ نفر از ۱۲۰ بیمار) در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص بیماری اتفاق می‌افتد. در حالی که در هیچ یک از نمونه‌های شاهد منفی، متیلاسیون این ژن‌ها مشاهده

نگردید. متیلاسیون مهارکننده‌های دیگر مسیر پیام‌رسانی Wnt مانند متیلاسیون ژن‌های SFRP (Secreted frizzled-related protein)، در بعضی بدخیمی‌ها از جمله در AML دیده شده است (۲۳). Yu و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که متیلاسیون پروموتور ژن DKK1 به عنوان آنتاگونیست مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin، در ارتباط با پیش‌آگهی بد در بیماران مبتلا به سرطان معده می‌باشد (۲۴). اختلالات اپی‌ژنتیکی در مقایسه با تغییرات ژنتیکی برگشت پذیر هستند و توسط عوامل دمتیله‌کننده‌ی DNA از جمله AZA و ۵-آزا-۲-داکسی سیتیدین که در درمان بدخیمی‌های خونی نقش دارند، درمان می‌شوند (۶-۳). Cooper و همکاران بعد از تحقیقاتشان پیشنهاد کردند که SFRP نو ترکیب، ممکن است یک استراتژی درمانی جدیدی برای سرطان‌هایی باشد که بیان SFRP (یکی دیگر از مهارکننده‌های مسیر پیام‌رسانی Wnt) در آن‌ها مهار شده است (۲۵). ژن DKK1 بر روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد، که تمایز رده‌های سلولی سرطانی انسان و انواع زیادی از سرطان‌های انسانی از جمله کارسینومای سلول بزرگ ریه (۲۷-۲۶)، کارسینومای سلول کلیوی انسان (۲۶) و لوسمی لنفوبلاستیک حاد (۲۸) را سرکوب می‌کند. همچنین ممکن است به عنوان یک ژن سرکوب‌کننده‌ی تومور مطرح باشد. درصد بیماران با متیلاسیون نابه‌جا برای ژن‌های WIF1 و DKK1 در این مطالعه ۸۷ بیمار (۷۲/۵ درصد) برای WIF1 و ۷۴ بیمار (۶۱/۶ درصد) برای DKK1 مشاهده گردید. بنابراین متیلاسیون این ژن‌ها ممکن است از طریق تنظیم کاهشی مسیر پیام‌رسانی Wnt، در شروع AML دخالت داشته باشد. از طرف



بیشترین هایپرمتیلاسیون ژن WIF1 ۸۰ درصد ( $P = ۰/۰۰۳۰$ ) و ژن DKK1 ۷۰ درصد ( $P = ۰/۰۰۵۰$ ) می‌باشد. در حالی که در زیر گروه AML-M۵ کمترین هایپرمتیلاسیون ژن WIF1 ۲۲/۲ درصد ( $P = ۰/۲۲۸۰$ ) و ژن DKK1 ۱۱/۱۱ درصد ( $P = ۰/۰۹۴۰$ ) اتفاق می‌افتد.

Hou و همکاران پیشنهاد کردند که فراوانی هایپرمتیلاسیون ژن DKK1 به همراه هایپرمتیلاسیون خانواده‌ی SFRP اتفاق می‌افتد ( $P < ۰/۰۰۰۱$ ). در حالی که با WIF1 همراه نیست ( $P = ۰/۷۶۴۰$ ) (۳۱). در این مطالعه، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 و عوامل پیش‌آگهی دهنده‌ی مرسوم مانند سن و شمارش گلبول‌های سفید در بیماران AML مشاهده نشد. همچنین هیچ ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون این ژن‌ها و دیگر شاخصه‌های بالینی بیماران مانند جنس، شمارش پلاکت و هموگلوبین مشاهده نگردید. این امر ممکن است مرتبط با افزایش اندازه‌ی نمونه‌ها باشد. در بین ۱۲۰ بیمار، پس از شیمی درمانی القایی در ۹۵ بیمار (۷۹/۱ درصد) بهبودی کامل مشاهده شده بود. بهبودی کامل به حضور کمتر از ۵ درصد بلاست در مغز استخوان و تصحیح شمارش سلول‌های خونی (شمارش نوتروفیل بیشتر از ۱۰۰۰ سلول در میکرولیتر، شمارش پلاکت بیشتر از ۱۰۰۰۰۰ سلول در میکرولیتر، هموگلوبین بیشتر از ۱۰ g/dl و عدم حضور بلاست در خون محیطی) اطلاق می‌شود. همچنین سلولاریته‌ی بیش از ۲۰ درصد مغز استخوان با شواهدی از خون‌سازی هر سه رده‌ی سلولی، باید وجود داشته باشد (۳۲).

در مطالعه‌ی حاضر، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری

دیگر، Suzuki و همکاران یک ارتباط احتمالی بین کاهش بقا و هایپرمتیلاسیون پروموتور DKK1 پیشنهاد کردند (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 (به ترتیب ۳۵ درصد و ۲۸/۳ درصد، در کل ۶۳/۳ درصد) مشاهده گردید که بیشتر از گزارش Griffiths و همکاران (به ترتیب ۳۲ درصد و ۱۶ درصد، در کل ۴۸ درصد) (۳۰) و گزارش Hou و همکاران (به ترتیب ۲۶ درصد و ۳۰/۱ درصد، در کل ۵۶/۱ درصد) بود (۳۱). این اختلافات ممکن است ناشی از تفاوت در انتخاب بیمار و تنوع نژادی بیماران باشد. مطالعه‌ی حاضر نیز همانند مطالعات دیگر نشان داد که ژن‌های WIF1 و DKK1 از اهداف تعدیل‌کننده‌ی ژنتیکی در بیماران AML هستند که به دنبال متیلاسیون غیر فعال می‌گردند.

Hou و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که بیشترین هایپرمتیلاسیون مهارکننده‌های مسیر پیام‌رسانی Wnt در AML با زیر گروه M۰ (۱۰۰ درصد) رخ می‌دهد، در حالی که کمترین هایپرمتیلاسیون (۴۸/۳ درصد با  $P = ۰/۰۰۰۶$ ) در زیر گروه M۴/M۵ اتفاق می‌افتد (۳۱). همچنین Hou و همکاران گزارش کردند که متیلاسیون ژن DKK1 در زیر گروه AML-M۰ شایع‌تر (۷۵ درصد با  $P = ۰/۰۱۰۵$ ) و متیلاسیون ژن WIF1 بیشتر در زیر گروه M۱ ( $P = ۰/۰۰۳۵$ ) (به ترتیب ۴۲/۱ درصد با  $P = ۰/۰۰۰۵$ ) اتفاق می‌افتد (۳۱). مطالعه‌ی حاضر نشان داد که متیلاسیون نابه‌جای این ژن‌ها در تمام زیر گروه‌های FAB-AML شامل M۰، M۱، M۲، M۴، M۵ و M۶ اتفاق می‌افتد. در بیماران با زیر گروه AML-M۰

مطالعات بیشتری با تعداد نمونه‌های مبتلا به AML بیشتر برای تثبیت این نظر نیاز است. به طور خلاصه، این مطالعه نشان داد که متیلاسیون جزایر CpG ژن‌های WIF1 و DKK1 یک پدیده‌ی شایع در بیماران AML است و مطالعه‌ی آنتاگونیست‌های دیگر مسیر پیام‌رسانی Wnt توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌ی اجرای این مطالعه را تأمین نمود، قدردانی می‌گردد.

بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های WIF1 و DKK1 و بهبودی کامل پس از شیمی‌درمانی القایی مشاهده نگردید و پاسخ به درمان در بیماران با و بدون هایپرمتیلاسیون یکسان بود. اگر چه Chim و همکاران (۳۳) نشان دادند که متیلاسیون WIF1 یک عامل غیر وابسته‌ی پیش‌آگهی دهنده‌ی ضعیف برای DFS (Disease-free survival) می‌باشد، Valencia و همکاران (۳۴) نشان دادند که بیماران مبتلا به AML با داشتن چند ژن متیله‌ی مهار کننده‌ی Wnt، دارای پیش‌آگهی ضعیف‌تر RFS (Relapse-free survival) هستند.

### References

- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(14): 1051-62.
- Galm O, Herman JG. Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods Mol Med* 2005; 113: 279-91.
- Gilbert J, Gore SD, Herman JG, Carducci MA. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2004; 10(14): 4589-96.
- Claus R, Almstedt M, Lubbert M. Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol* 2005; 32(5): 511-20.
- Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109(1): 52-7.
- Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(8): 1472-81.
- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006; 25(29): 4116-21.
- Parkin D, Whelan S, Ferlay J, Teppo L, Thomas D. Cancer incidence in five continents. Volume VIII. *IARC Sci Publ* 2002; (155): 1-781.
- Jost E, Schmid J, Wilop S, Schubert C, Suzuki H, Herman JG, et al. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008; 142(5): 745-53.
- Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5): 387-98.
- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351(7): 657-67.
- Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasia* 2008; 55(3): 165-76.
- Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 2002; 24(9): 811-20.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810.
- Marsit CJ, Karagas MR, Andrew A, Liu M, Danaee H, Schned AR, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7081-5.
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 2008;

- 121(Pt 6): 737-46.
17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
  18. Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y, Zheng DL, Yang PY, et al. Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2007; 7: 126.
  19. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(1): 55-67.
  20. Mikesch JH, Steffen B, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21(8): 1638-47.
  21. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990): 457-63.
  22. Nakamoto D, Yamamoto N, Takagi R, Katakura A, Mizoe JE, Shibahara T. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of malignant mucosal melanoma using whole genome amplification. *Bull Tokyo Dent Coll* 2008; 49(2): 77-87.
  23. Ghasemi A, Nadali F, Chahardouli B, Alizad Ghandforosh N, Ghavamzadeh A, Rostami Sh. Study of correlation between SFRP-1 and SFRP-2 hypermethylation with relapse, complete remission, genetic mutations of FLT3-ITD and NPM1 and immunophenotypes of leukemic cells in patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *J Hematol* 2014; 3(2): 34-42.
  24. Yu J, Tao Q, Cheng YY, Lee KY, Ng SS, Cheung KF, et al. Promoter methylation of the Wnt/beta-catenin signaling antagonist Dkk-3 is associated with poor survival in gastric cancer. *Cancer* 2009; 115(1): 49-60.
  25. Cooper SJ, von Roemeling CA, Kang KH, Marlow LA, Grebe SK, Menefee ME, et al. Reexpression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(10): 2105-15.
  26. Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, et al. Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* 2004; 171(3): 1314-8.
  27. Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, Miyazaki M, et al. Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2001; 19(1): 117-21.
  28. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, et al. Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 2004; 91(4): 707-13.
  29. Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, Shimada M, Fukagawa S, Tsuboi K, et al. Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 138(5): 624-31.
  30. Griffiths EA, Gore SD, Hooker C, McDevitt MA, Karp JE, Smith BD, et al. Acute myeloid leukemia is characterized by Wnt pathway inhibitor promoter hypermethylation. *Leuk Lymphoma* 2010; 51(9): 1711-9.
  31. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Lee MC, Tang JL, Chen CY, et al. Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2011; 105(12): 1927-33.
  32. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50(3): 197-222.
  33. Chim CS, Chan WW, Pang A, Kwong YL. Preferential methylation of Wnt inhibitory factor-1 in acute promyelocytic leukemia: an independent poor prognostic factor. *Leukemia* 2006; 20(5): 907-9.
  34. Valencia A, Roman-Gomez J, Cervera J, Such E, Barragan E, Bolufer P, et al. Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23(9): 1658-66.

## Dysregulation of the Wnt Signaling Pathway through Methylation of WIF1 and DKK1 Genes in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) at the Time of Diagnosis

Ali Ghasemi MSc<sup>1</sup>, Mohsen Mohammadi PhD<sup>2</sup>, Abbas Ghotaslou MSc<sup>1</sup>,  
Kazem Ghaffari MSc<sup>3</sup>, Sadegh Abbasian MSc<sup>1</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** In acute myeloid leukemia (AML), a large number of tumor suppressor genes are silenced through DNA methylation such as CDKN2B and p73. Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) and Dickkopf-1 (DKK-1) are negative regulator of the Wnt signaling pathway. In the present study, we studied the methylation status of WIF1 and DKK-1 genes in patients with acute myeloid leukemia.

**Methods:** Blood samples from 120 patients with acute myeloid leukemia and 25 healthy control subjects were taken. Isolated DNA was treated with sodium bisulphite and examined via methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with primers specific for methylated and unmethylated sequences of the WIF1 and DKK-1 genes.

**Findings:** The frequency of aberrant hypermethylation of WIF1 and DKK-1 genes in patients with acute myeloid leukemia was determined 35.0% (42/120) and 28.3% (34/120), respectively. In addition, for all subjects in control group, methylation of WIF1 and DKK-1 genes were negative. Patients with M0 subtype of French-American-British acute myeloid leukemia (FAB-AML) had the highest incidence of hypermethylation of WIF1 (P = 0.003) and DKK-1 (P = 0.005) genes.

**Conclusion:** The present study showed that, like many solid tumors, WIF1 and DKK-1 genes methylation also occurs in acute myeloid leukemia. Therefore, the methylation of these genes may play a role in leukemogenesis initiation.

**Keywords:** DNA Methylation, WIF1, DKK, Acute myeloid leukemia

**Citation:** Ghasemi A, Mohammadi M, Ghotaslou A, Ghaffari K, Abbasian S. **Dysregulation of the Wnt Signaling Pathway through Methylation of WIF1 and DKK1 Genes in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) at the Time of Diagnosis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(306): 1757-66

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

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

3- Instructor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

**Corresponding Author:** Ali Ghasemi MSc, Email: a.qasemi2012@yahoo.com

## بررسی نتایج حاصل از درمان توسط تکنیک‌های کمک باروری در بیمارستان شهید بهشتی اصفهان

دکتر روشنک ابوترابی<sup>۱</sup>، دکتر ویدا رضوی<sup>۲</sup>، شکوفه بقازاده<sup>۳</sup>، لاله شارق<sup>۴</sup>، دکتر فاطمه‌سادات مصطفوی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** امروزه استفاده از تکنیک‌های کمک باروری، مشکل بسیاری از افراد نابارور را برطرف نموده است. تکرار سیکل‌های درمانی، صرف وقت و هزینه‌ی به نسبت زیاد و مشکلات احتمالی ناشی از بیهوشی‌های مکرر، محققین را به سمت یافتن راه‌هایی برای پیش‌بینی میزان موفقیت هر یک از تکنیک‌ها هدایت نموده است. این تحقیق، با هدف بررسی میزان موفقیت روش‌های کمک باروری انجام گرفت.

**روش‌ها:** مطالعه‌ی حاضر، گذشته نگر بود و جمعیت مورد مطالعه، ۷۱ زوجی بودند که طی شش ماهه‌ی اول سال ۱۳۹۲ جهت انجام تکنیک‌های کمک باروری به مرکز درمان ناباروری شهید بهشتی شهر اصفهان مراجعه کرده بودند. معیار اصلی در حصول نتایج، بارداری بالینی دو هفته پس از قرار دادن جنین در رحم مادر بود. اطلاعات مورد نیاز مانند سن و نتایج آزمایش‌های مایع منی و نیز نتیجه‌ی حاصل از انجام تکنیک‌های کمک باروری، از پرونده‌ی این بیماران استخراج شد.

**یافته‌ها:** از کل زوج‌های تحت بررسی، ۴۲ مورد تحت درمان به روش تلقیح داخل رحمی اسپرم (IUI یا Intrauterine insemination) و ۲۹ مورد تحت درمان به روش لقاح آزمایشگاهی (IVF/ICSI یا In-vitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection) قرار گرفتند. از ۴۲ دوره IUI، ۱۰ دوره‌ی موفق (۲۳/۸ درصد) و از ۲۹ دوره IVF/ICSI نیز ۷ دوره‌ی موفق (۲۴/۱ درصد) دیده شد. میانگین سنی زنان و مردان و مدت زمان ناباروری در دو گروه موفق و ناموفق در مورد روش IUI اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. در حالی که این میانگین در مورد روش IVF/ICSI معنی‌دار بود. میان پارامترهای اسپرمی نیز بین دو گروه موفق و ناموفق در گروه درمانی IUI ارتباط آماری معنی‌داری یافت نشد، اما در مورد گروه درمانی IVF/ICSI درصد اسپرم‌های سریع به صورت معنی‌داری در دو گروه موفق و ناموفق متفاوت بود.

**نتیجه‌گیری:** آنالیز مرسوم منی و سن زن و شوهر نمی‌توانند پیش‌بینی کننده‌ی نتایج استفاده از روش IUI باشند، اما میزان موفقیت روش IVF/ICSI در موارد سن پایین‌تر زوجین، همچنین مدت زمان ناباروری کمتر و پارامترهای اسپرمی بهتر، افزایش می‌یابد.

**واژگان کلیدی:** ناباروری، روش‌های کمک باروری، Intrauterine insemination، In-vitro fertilization، Intracytoplasmic sperm injection، پارامترهای اسپرم

**ارجاع:** ابوترابی روشنک، رضوی ویدا، بقازاده شکوفه، شارق لاله، مصطفوی فاطمه‌سادات. **بررسی نتایج حاصل از درمان توسط تکنیک‌های**

**کمک باروری در بیمارستان شهید بهشتی اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۶): ۱۷۶۷-۱۷۸۱

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و آزمایشگاه نازایی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- متخصص زنان و زایمان، بخش نازایی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- آزمایشگاه نازایی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- بخش نازایی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و آزمایشگاه نازایی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## مقدمه

شیوع ناباروری در جامعه حدود ۱۵-۱۰ درصد می‌باشد (۱). احتمال ناباروری با علل مردانه، به طور تقریبی نیمی از موارد را شامل می‌شود (۲). از جمله روش‌های درمانی نازایی، تلقیح داخل رحمی اسپرم (IUI یا Intrauterine insemination) و لقاح آزمایشگاهی (IVF/ICSI یا in vitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection) می‌باشند که در طیف وسیعی از ناباروری‌ها از جمله نازایی به علت عوامل سرویکال، عدم تخمک‌گذاری، اندومترئوز، عامل ایمونولوژیکی، ناباروری با علت مردانه و عوامل ناشناخته استفاده می‌شوند (۳). با وجودی که استفاده از این روش‌ها طی دهه‌های گذشته دو برابر شده است، اما میزان موفقیت آن‌ها افزایش چشمگیری را نشان نمی‌دهد (۴). میزان موفقیت این روش‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار دارد و در مطالعات و مراکز مختلف متفاوت گزارش شده است (۵).

در مطالعات مختلف، مشخص گردیده است که با تحریک تخمک‌گذاری و به دنبال آن استفاده از روش‌های کمک باروری، میزان موفقیت و ایجاد حاملگی در زوج‌های نابارور افزایش چشمگیری داشته است (۵). برای مثال، در مطالعه‌ی Jarvela و همکاران، این میزان ۱۹/۶ درصد گزارش شد (۶). در مطالعه‌ی دیگری که با استفاده از کلومیفن سیترات و سایر گنادوتروپین‌ها جهت تحریک تخمک‌گذاری انجام گرفت، مشخص شد که در بیماران با سن کمتر از ۳۰ سال و مدت زمان ناباروری حدود ۴ سال، میزان موفقیت این روش تا ۲۲ درصد افزایش یافته است (۷). به طور کلی، میزان موفقیت IUI متفاوت است و

در گزارش‌های مختلف، متفاوت بیان شده است. در رابطه با میزان موفقیت روش IVF/ICSI نیز اعداد و ارقام مختلفی گزارش شده است. این میزان در برخی مطالعات تا حدود ۴۰ درصد نیز آمده است (۸). با وجود پیشرفت‌های زیادی که در زمینه‌ی تکنیک‌های کمک به افراد نابارور به وجود آمده است، میزان موفقیت روش IVF/ICSI طی سال‌های گذشته ثابت و حدود ۳۰ درصد بوده است (۹). در مطالعه‌ی Sunderam و همکاران، به طور کلی میزان موفقیت روش‌های کمک باروری ۳۱/۴ درصد ذکر شده است (۱۰).

تفاوت‌هایی که در میزان موفقیت این روش‌ها مشاهده می‌شود، می‌تواند به دلیل تفاوت افراد، پروتکل‌های تحریک تخمدانی (۱۱)، زمان و تعداد دفعات تلقیح (۱۲)، تعداد سیکل‌های درمان، اتیلوژی و مدت زمان ناباروری (۱۳) و تعداد کل اسپرم‌های تلقیح شده (۱۴) باشد. سن زنان نیز از جمله عوامل تأثیرگذار است و در بسیاری موارد، میزان موفقیت با توجه به آن دسته‌بندی و گزارش شده است (۱۵، ۷). با توجه به اهمیت آنالیز منی در تشخیص علل مربوط به ناباروری مردانه، ارتباط بین پارامترهای اسپرم و میزان موفقیت روش‌های کمک باروری همواره ذهن پژوهشگران را به خود مشغول کرده و پژوهش‌های متعددی در این زمینه انجام شده است که گاه، نتایج متناقضی را ارائه کرده‌اند. در پژوهش جهانیان و همکاران، مشخص شد که با افزایش تعداد اسپرم‌های متحرک، میزان موفقیت افزایش می‌یابد (۱۶). طبق نتایج حاصل از این مطالعه، هیچ کدام از علل ناباروری، سن زن و روش درمان نقشی در میزان موفقیت نداشته و فقط طول مدت ناباروری زوجین،



مؤثر بوده است (۱۷).

در مطالعه‌ای دیگر، بیان شد که تعداد اسپرم‌های متحرک تلقیح شده، مورفولوژی اسپرم، طول مدت ناباروری، سن زن، اتیولوژی ناباروری و روش درمانی، از جمله عواملی هستند که در میزان موفقیت روش‌های کمک باروری مؤثر هستند (۱۸). گروه دیگری از محققین نیز بر تأثیر تعداد کل اسپرم متحرک بر میزان موفقیت این روش‌ها تأکید دارند (۱۹). اما در تحقیق دیگری که توسط Shulman و همکاران انجام گرفت، مشخص شد که فقط عامل کیفیت اسپرم بر نتیجه‌ی به دست آمده تأثیر دارد (۲۰). اهمیت سن زن و مرد نیز در مطالعات مختلف مد نظر بوده است (۱۵، ۷) و در این مورد نیز نتایج همواره همسو نبوده‌اند.

در مطالعات انجام گرفته در مراکز مختلف، میزان موفقیت استفاده از روش‌های کمک باروری و همچنین میزان دخالت عوامل مختلف، متفاوت ذکر گردیده‌اند. بنابراین مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی میزان موفقیت این روش‌ها و همچنین یک سری از عوامل تأثیرگذار بر آن در زوجین مراجعه کننده به مرکز ناباروری شهید بهشتی شهر اصفهان انجام شد. به طور حتم، جمع‌آوری این اطلاعات می‌تواند راهگشای ما در زمینه‌ی بهبود عملکرد و ارتقای سطح کیفی کار و در نتیجه برداشتن گام‌های بلندتر به سوی درمان بیماران نابارور باشد.

داشتند، طی شش ماهه‌ی اول سال ۱۳۹۲ مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات مورد نیاز از پرونده‌های موجود در بیمارستان استخراج گردید. در صورت انجام هر کدام از روش‌های کمک باروری (ART یا Assistant reproductive techniques) بیش از یک دوره‌ی شش ماهه‌ی مورد مطالعه، فقط یک دوره از هر زوج وارد مطالعه شد. افراد تحت بررسی به دو گروه تقسیم شدند: گروهی که در آن‌ها بارداری رخ داده بود و گروه دیگر که باردار نشده بودند.

تمامی نمونه‌های مایع منی پس از ۳-۷ روز پرهیز جنسی تهیه شد و پس از آب‌گونه شدن (Liquefaction) مایع سمینال، آنالیز پارامترهای اسپرم (حجم، تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم) بر اساس استانداردهای سازمان بهداشت جهانی (WHO ۲۰۱۰) یا (World health organization ۲۰۱۰) با هر دو روش دستی و کامپیوتری (CASA یا Computer-assisted sperm analysis) صورت گرفت. خصوصیات شکلی اسپرم با استفاده از معیارهای Kruger بررسی و ارایه گردید (۲۱).

به منظور ارتباط میان میزان حاملگی با پارامترهای اسپرم و سایر متغیرها، از آزمون‌های  $\chi^2$  Fisher's exact و t استفاده گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام و  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## روش‌ها

این مطالعه به طور گذشته‌نگر انجام گرفت. در این مطالعه، تعداد ۷۱ زوج نابارور که اولین مراجعه به درمانگاه نازایی بیمارستان شهید بهشتی اصفهان را

## یافته‌ها

در این مطالعه، در مجموع ۷۱ بیمار مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. میزان موفقیت روش‌های کمک باروری ۲۳/۹۴ درصد گزارش گردید که در مقایسه

۱۰ نفر (۲۳/۸ درصد) موفقیت‌آمیز بود و حاملگی در مورد آن‌ها رخ داد. در جدول ۱، توزیع فراوانی متغیرهای دموگرافیک و سوابق بیماران بر حسب موفقیت و عدم موفقیت در باروری به کمک روش IUI آمده است. بر اساس این جدول، هیچ کدام از عوامل دموگرافیک و سوابق در دو گروه بارور شده و بارور نشده، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

با سایر آمارهای مشابه قابل قبول می‌باشد. همچنین مشخص شد که عواملی از جمله سن بیماران، مدت زمان ناباروری و پارامترهای اسپرم نمی‌توانند به طور قطع پیش‌بینی کننده‌ی نتایج انجام روش‌ها باشند. به طور جداگانه، میانگین سن بیماران تحت درمان با روش IUI  $31/9 \pm 5/4$  سال و میانگین سن همسران آن‌ها  $36/0 \pm 8/7$  سال بود. از ۴۲ بیماری که با این روش تحت درمان قرار گرفتند، نتیجه در

جدول ۱. توزیع فراوانی متغیرهای دموگرافیک و عمومی بر حسب موفقیت و عدم موفقیت در بارداری به دنبال انجام روش‌های کمک باروری

مقدار P	IVF/ICSI		مقدار P	IUI		سطح	متغیر
	ناموفق	موفق		ناموفق	موفق		
۰/۰۵۰	۷ (۳۱/۸۱)	۴ (۵۷/۱۰)	۰/۴۰۰	۲۳ (۷۱/۹۰)	۹ (۹۰/۰۰)	زیر ۳۵ سال	گروه سنی
	۱۵ (۶۸/۱۹)	۳ (۴۲/۹۰)		۹ (۲۸/۱۰)	۱ (۱۰/۰۰)	۳۵ سال و بالاتر	
۰/۰۰۹	$42/6 \pm 4/9$	$35/7 \pm 5/9$	۰/۳۴۰	$36/8 \pm 8/9$	$33/8 \pm 8/0$	سال (میانگین)	سن شوهر
۰/۰۳۵	$12/0 \pm 4/5$	$7/1 \pm 5/2$	۰/۸۷۰	$7/3 \pm 4/4$	$7/1 \pm 2/8$	سال (میانگین)	مدت ازدواج
۰/۰۲۶	$11/3 \pm 5/1$	$6/2 \pm 5/0$	۰/۸۵۰	$6/2 \pm 4/0$	$5/9 \pm 2/4$	سال	مدت ناباروری
۰/۳۵۰	۱۵ (۶۸/۲)	۵ (۷۱/۴)	۰/۶۵۰	۱۸ (۵۶/۳)	۵ (۵۰/۰)	نداشته	روش پیشگیری از بارداری
	۴ (۱۸/۲)	۰ (۰)		۳ (۹/۴)	۱ (۱۰/۰)	طبیعی	
	۱ (۴/۵)	۰ (۰)		۷ (۲۱/۹)	۱ (۱۰/۰)	LD	
	۱ (۴/۵)	۲ (۲۸/۶)		۳ (۹/۴)	۲ (۲۰/۰)	کاندوم	
۰/۰۰۷	۱ (۴/۵)	۰ (۰)	۰/۳۷۰	۱ (۳/۱)	۱ (۱۰/۰)	IUD	سابقه‌ی فامیلی ناباروری (زن)
	۲۱ (۹۵/۵)	۳ (۴۲/۹)		۲۷ (۸۴/۴)	۷ (۷۰/۰)	خیر	
۰/۹۹۰	۱ (۴/۵)	۴ (۵۷/۱)	۰/۹۹۰	۵ (۱۵/۶)	۳ (۳۰/۰)	بلی	سابقه‌ی فامیلی ناباروری (مرد)
	۱۹ (۸۶/۴)	۶ (۸۵/۷)		۲۷ (۸۴/۴)	۹ (۹۰/۰)	خیر	
۱/۰۰۰	۳ (۱۳/۶)	۱ (۱۴/۳)	۰/۵۶۰	۵ (۱۵/۶)	۱ (۱۰/۰)	بلی	سابقه‌ی هیپو تیروئیدی (زن)
	۲۲ (۱۰۰)	۷ (۱۰۰)		۲۸ (۸۷/۵)	۱۰ (۱۰۰)	خیر	
۱/۰۰۰	۰ (۰)	۰ (۰)	۱/۰۰۰	۴ (۱۲/۵)	۰ (۰)	بلی	سابقه‌ی هیپر تیروئیدی (زن)
	۲۲ (۱۰۰)	۷ (۱۰۰)		۳۲ (۱۰۰)	۱۰ (۱۰۰)	خیر	
۱/۰۰۰	۰ (۰)	۰ (۰)	۱/۰۰۰	۰ (۰)	۰ (۰)	بلی	سابقه‌ی اعتیاد در زن
	۲۲ (۱۰۰)	۷ (۱۰۰)		۳۲ (۱۰۰)	۱۰ (۱۰۰)	خیر	
۰/۹۹۰	۰ (۰)	۰ (۰)	۱/۰۰۰	۰ (۰)	۰ (۰)	بلی	سابقه‌ی اعتیاد در مرد
	۲۰ (۹۰/۹)	۷ (۱۰۰)		۳۲ (۱۰۰)	۱۰ (۱۰۰)	خیر	
	۲ (۹/۱)	۰ (۰)		۰ (۰)	۰ (۰)	بلی	

IUI: Intrauterine insemination; IVF/ICSI: In vitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection  
LD: Low dose estrogen; IUD: Intrauterine device



از ۱۰ مورد باروری موفق، ۸ نفر (۸۰ درصد) دارای سابقه‌ی قبلی تلاش برای بارداری با روش IUI بوده‌اند. همچنین از ۳۲ مورد باروری ناموفق نیز، ۱۸ نفر (۵۶/۳ درصد) دارای چنین سابقه‌ای بودند که طبق آزمون Fisher's exact، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه موفق و ناموفق وجود نداشت. در این گروه، ۳ مورد (۳۰ درصد) از باروری‌های موفق، حاصل اولین تلاش برای بارداری بودند. در گروه ناموفق نیز ۱۴ نفر (۴۳/۸ درصد) اولین تجربه‌ی درمانی برای باروری را داشتند. در افراد مورد مطالعه، ۷ مورد از باروری‌های موفق و ۲ مورد از باروری‌های ناموفق، دارای فرزند

بودند (۷۰ درصد در مقابل ۶/۳ درصد) که طبق آزمون Fisher's exact، تفاوت میان دو گروه، معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ).  
 نوع ناباروری در ۱ نفر (۳/۱ درصد) از گروه ناموفق از نوع ثانویه و در بقیه‌ی بیماران این گروه، از نوع اولیه بود.  
 در جدول ۲، توزیع فراوانی سوابق باروری و بیماری در دو گروه موفق و ناموفق آمده است. مطابق این جدول، فراوانی متغیرهای مطالعه شده بین دو دسته‌ی موفق و ناموفق از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

جدول ۲. توزیع فراوانی سوابق باروری و بیماری بر حسب موفقیت و عدم موفقیت در بارداری به دنبال انجام روش‌های کمک باروری

متغیر	سطح	IUI		IVF/ICSI	
		موفق	ناموفق	موفق	ناموفق
داشتن فرزند	خیر	۳ (۳۰/۰)	۳۰ (۹۳/۸)	۵ (۷۱/۴)	۲۱ (۹۵/۵)
	بلی	۷ (۷۰/۰)	۲ (۶/۳)	۲ (۲۸/۶)	۱ (۴/۵)
نوع ناباروری	اولیه	۱۰ (۱۰۰)	۳۱ (۹۶/۹)	۷ (۱۰۰)	۲۲ (۱۰۰)
	ثانویه	۰ (۰)	۱ (۳/۱)	۰ (۰)	۰ (۰)
	سابقه‌ی سقط	۸ (۸۰/۸)	۳۱ (۹۶/۹)	۷ (۱۰۰)	۲۲ (۱۰۰)
سابقه‌ی مرده‌زایی	خیر	۹ (۹۰/۰)	۳۲ (۱۰۰)	۷ (۱۰۰)	۲۲ (۱۰۰)
	بلی	۱ (۱۰/۰)	۱ (۳/۱)	۰ (۰)	۰ (۰)
ابتلا به PCOS	خیر	۱۰ (۱۰۰)	۲۶ (۸۱/۳)	۶ (۸۵/۷)	۱۸ (۸۱/۸)
	بلی	۰ (۰)	۶ (۱۸/۸)	۱ (۱۴/۳)	۴ (۱۸/۲)
هیرسوتیسم	خیر	۱۰ (۱۰۰)	۲۶ (۸۱/۳)	۶ (۸۵/۷)	۱۹ (۸۶/۴)
	بلی	۰ (۰)	۶ (۱۸/۸)	۱ (۱۴/۳)	۳ (۱۳/۶)
سابقه‌ی لاپاراسکوپی	خیر	۵ (۵۰/۰)	۲۰ (۶۲/۵)	۳ (۴۲/۹)	۱۰ (۴۵/۵)
	بلی (طبیعی)	۳ (۳۰/۰)	۶ (۱۸/۸)	۲ (۲۸/۶)	۵ (۲۲/۷)
سابقه‌ی واریکوسلکتومی	بلی (اندومتریوز)	۲ (۲۰/۰)	۶ (۱۸/۸)	۲ (۲۸/۶)	۷ (۳۱/۸)
	خیر	۱۰ (۱۰۰)	۳۱ (۹۶/۹)	۵ (۷۱/۴)	۱۵ (۶۸/۲)
وازکتومی همسر	بلی	۰ (۰)	۱ (۳/۱)	۲ (۲۸/۶)	۷ (۳۱/۸)
	خیر	۱۰ (۱۰۰)	۳۲ (۱۰۰)	۶ (۸۵/۷)	۲۰ (۹۰/۹)
ازدواج فامیلی	بلی	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۱۴/۳)	۲ (۹/۱)
	خیر	۹ (۹۰)	۲۸ (۸۷/۵)	۶ (۸۵/۷)	۱۹ (۸۶/۴)
وضعیت قاعدگی	بلی	۱ (۱۰)	۴ (۱۲/۵)	۱ (۱۴/۳)	۳ (۱۳/۶)
	طبیعی	۷ (۷۰)	۲۶ (۸۱/۳)	۶ (۸۵/۷)	۱۶ (۷۲/۷)
	غیر طبیعی	۳ (۳۰)	۶ (۱۸/۸)	۱ (۱۴/۳)	۶ (۲۷/۳)

IUI: Intrauterine insemination; IVF/ICSI: In vitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection; PCOS: Polycystic ovary syndrome

ارتباط بین پارامترهای آنالیز منی و نتایج IUI در دو گروه موفق و ناموفق در جدول ۳ آمده است. تعداد اسپرم در واحد حجم (غلظت اسپرم) در گروه موفق  $151/9 \pm 65/0$  میلیون در سی‌سی و در گروه ناموفق  $136/3 \pm 76/3$  میلیون در سی‌سی بود و دو گروه از لحاظ غلظت اسپرم، تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. شکل طبیعی اسپرم در گروه موفق  $13/1 \pm 26/5$  درصد و در گروه ناموفق  $13/1 \pm 26/0$  درصد بود و دو گروه از این نظر نیز

تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. تحرک تام در گروه موفق  $11/5 \pm 89/9$  درصد و در گروه ناموفق  $16/43 \pm 91/03$  بود و دو گروه، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. از لحاظ تحرک کلاس A (اسپرم‌های با حرکت سریع به جلو) و A + B (اسپرم‌های با حرکت سریع رو به جلو + اسپرم‌های با حرکت کند رو به جلو) نیز اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳. توزیع شاخص‌های اسپرمی در دو گروه باروری موفق و ناموفق به دنبال انجام روش‌های کمک باروری

متغیر	سطح	IUI		IVF/ICSI	
		موفق	ناموفق	موفق	ناموفق
مایع سیمن	حجم	$2/70 \pm 0/75$	$3/13 \pm 1/20$	$2/93 \pm 0/61$	$2/80 \pm 1/46$
	pH	$8/05 \pm 0/16$	$7/97 \pm 1/50$	$8/07 \pm 0/19$	$8/41 \pm 0/43$
تعداد اسپرم در واحد حجم (ml/میلیون)	قبل	$151/90 \pm 65/00$	$136/30 \pm 76/30$	$160/30 \pm 70/40$	$100/90 \pm 82/10$
	بعد	$146/10 \pm 52/60$	$124/40 \pm 79/30$	$190/60 \pm 101/10$	$121/40 \pm 94/20$
درصد اسپرم‌های با حرکت سریع به جلو	قبل	$9/40 \pm 7/50$	$13/10 \pm 11/80$	$20/90 \pm 13/80$	$6/80 \pm 10/10$
	بعد	$42/20 \pm 17/10$	$45/10 \pm 18/70$	$39/10 \pm 19/20$	$26/70 \pm 19/20$
درصد اسپرم‌های با حرکت کند به جلو	قبل	$49/40 \pm 12/50$	$38/38 \pm 18/90$	$49/00 \pm 17/00$	$35/20 \pm 19/90$
	بعد	$22/20 \pm 12/10$	$21/30 \pm 13/10$	$28/90 \pm 16/70$	$25/50 \pm 12/10$
درصد اسپرم‌های بدون حرکت	قبل	$10/10 \pm 6/80$	$8/97 \pm 5/20$	$7/90 \pm 4/20$	$13/95 \pm 11/00$
	بعد	$7/10 \pm 5/60$	$6/63 \pm 4/60$	$18/10 \pm 5/20$	$32/20 \pm 18/40$
درصد اسپرم‌های با حرکت درجا	قبل	$31/10 \pm 14/50$	$36/30 \pm 18/60$	$22/29 \pm 6/10$	$44/05 \pm 19/80$
	بعد	$27/50 \pm 18/40$	$23/50 \pm 16/80$	$14/30 \pm 7/30$	$16/30 \pm 13/30$
درصد اسپرم‌های طبیعی	قبل	$26/50 \pm 13/10$	$26/00 \pm 13/10$	$21/10 \pm 8/60$	$21/86 \pm 13/80$
	بعد	$27/60 \pm 9/10$	$31/03 \pm 14/70$	$25/40 \pm 5/03$	$27/20 \pm 15/04$
درصد اسپرم‌های پاتولوژیک	قبل	$73/50 \pm 13/10$	$70/90 \pm 17/80$	$78/90 \pm 8/60$	$78/10 \pm 13/80$
	بعد	$72/40 \pm 9/10$	$64/56 \pm 19/10$	$74/57 \pm 5/00$	$73/23 \pm 15/50$
میانگین تعداد WBC	قبل	$0/40 \pm 0/22$	$1/02 \pm 0/24$	$1/50 \pm 1/76$	$0/50 \pm 0/77$
	بعد	0	$0/031 \pm 0/031$	$0/14 \pm 0/14$	$0/09 \pm 0/09$
Round cell	قبل	$2/35 \pm 2/20$	$5/23 \pm 5/30$	$3/50 \pm 2/50$	$1/93 \pm 1/70$
	بعد	$0/10 \pm 0/10$	0	$0/14 \pm 0/14$	$0/14 \pm 0/14$
Immature	قبل	$1/95 \pm 1/70$	$4/23 \pm 4/80$	$2/00 \pm 1/29$	$1/45 \pm 1/01$
	بعد	$0/10 \pm 0/32$	0	0	$0/046 \pm 0/045$

IUI: Intrauterine insemination; IVF/ICSI: In vitro fertilization/Intracytoplasmic sperm injection; WBC: White blood cell

۲۴/۱) درصد) باروری حاصل شد و نتیجه موفقیت‌آمیز بود. در جدول ۱، توزیع فراوانی متغیرهای دموگرافیک و سوابق بیماران بر حسب موفقیت و عدم موفقیت در باروری آمده است. بنابر اطلاعات موجود در این جدول، در مواردی از جمله سن زن و شوهر و مدت زمان ناباروری، میان دو گروه موفق و ناموفق از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۱).

در کل افراد تحت درمان با این روش، از ۷ مورد باروری موفق، ۳ مورد (۴۲/۹ درصد) دارای سابقه قبلی IVF بودند. همچنین از ۲۲ مورد باروری ناموفق، ۷ مورد (۳۱/۸ درصد) دارای سابقه تلاش برای باروری با این روش بودند و طبق این آزمون، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه موفق و ناموفق مشاهده نشد. قابل ذکر است که ۲ مورد (۲۸/۶ درصد) از باروری‌های موفق و ۸ مورد (۳۶/۴ درصد) از باروری‌های ناموفق، اولین تجربه‌ی درمانی خود را سپری می‌کردند. همچنین ۱ مورد از باروری‌های موفق و ۳ مورد از باروری‌های ناموفق، دارای سابقه‌ی ICS بودند.

در افراد تحت درمان، ۲ مورد از باروری‌های موفق و ۱ مورد از باروری‌های ناموفق، دارای فرزند بودند (۲۸/۶ درصد در مقابل ۴/۵ درصد)، اما طبق آزمون‌های آماری تفاوت بین دو گروه در این مورد نیز معنی‌دار نبود. نوع ناباروری در تمام بیماران این گروه از نوع اولیه بود. در جدول ۲، توزیع فراوانی سوابق باروری و بیماری در دو گروه موفق و ناموفق آمده است. مطابق این جدول، متغیرهای مورد مطالعه در بین دو گروه از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

قابل ذکر است که به دنبال انجام فراوری بر روی مایع منی، نتایج مثبتی در جهت بهبود برخی پارامترهای اسپرمی در هر دو گروه مشاهده شد، از جمله افزایش معنی‌دار ( $P < 0/050$ ) درصد تحرک کلاس A (اسپرم‌های با حرکت سریع رو به جلو) و همچنین کاهش معنی‌دار ( $P < 0/050$ ) درصد اسپرم‌های با حرکت کند رو به جلو.

درصد اسپرم‌های بدون حرکت و با حرکت درجا نیز کاهش داشتند، اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. درصد تحرک کلاس A + B (اسپرم‌های با حرکت سریع رو به جلو + اسپرم‌های با حرکت کند رو به جلو) نیز پس از فراوری در هر دو گروه افزایش داشت که البته از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. به دنبال انجام فراوری، غلظت اسپرم‌ها دچار کاهش آماری معنی‌دار نشده بود، همچنین تغییر قابل توجه آماری در میزان اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی نیز مشاهده نشد. در رابطه با تغییر تعداد سلول‌های WBC (White blood cell)، Round cell و Immature cell همان‌گونه که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، به دنبال انجام فراوری، تعداد این سلول‌ها به صورت معنی‌داری کاهش یافت. همچنین پارامتر آگلوتیناسیون تغییری نداشت، اما در مورد پارامتر اگریگاسیون کاهش معنی‌داری ملاحظه گردید (قبل و پس از فراوری).

در رابطه با ۲۹ بیماری که در این مطالعه با استفاده از روش IVF/ICSI تحت درمان قرار گرفته بودند، میانگین سن خانم‌های تحت درمان با روش IVF/ICSI  $33/0 \pm 6/4$  سال و میانگین سن شوهران آن‌ها  $37/3 \pm 6/3$  سال بود. از ۲۹ بیماری که تحت درمان با این روش قرار گرفتند، در ۷ مورد

اسپرم‌ها افزایش یافت که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. همچنین افزایش قابل توجه آماری در میزان اسپرم‌های دارای مورفولوژی طبیعی نیز مشاهده نشد. در رابطه با تغییر تعداد سلول‌های WBC، Round cell و Immature cell همان‌گونه که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، به دنبال انجام فراوری تعداد این سلول‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

### بحث

به دنبال انجام این تحقیق، میزان موفقیت روش‌های کمک باروری در مرکز درمان ناباروری شهید بهشتی شهر اصفهان در شش ماهه‌ی اول سال ۱۳۹۲، ۲۳/۹۴ درصد گزارش شد که در مقایسه با سایر آمارهای مشابه قابل قبول می‌باشد. همچنین مشخص شد که عواملی مانند سن بیماران، مدت زمان ناباروری و پارامترهای اسپرم نمی‌توانند به طور قطع پیش‌بینی‌کننده‌ی نتایج انجام روش‌ها باشند.

اگر چه مطالعات زیادی در ارتباط با میزان موفقیت در حاملگی به دنبال انجام روش‌های کمک باروری بر اساس پارامترهای اسپرم و همچنین برخی ویژگی‌های بیماران از جمله سن و تعداد سال‌های ناباروری آن‌ها، انجام شده است، اما میزان موفقیت استفاده از این روش‌ها و همچنین میزان تأثیر عوامل مختلف در روند آن‌ها، متفاوت ذکر گردیده است. بنابراین مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی میزان موفقیت و همین‌طور تأثیر عوامل مختلفی مانند سن بیماران زن و همسران آن‌ها، مدت ناباروری و پارامترهای اسپرم بر روی میزان موفقیت این روش‌ها در مرکز درمان ناباروری شهید بهشتی شهر اصفهان

ارتباط بین پارامترهای آنالیز منی و نتایج IVF/ICSI در دو گروه موفق و ناموفق در جدول ۳ آمده است. تعداد اسپرم در واحد حجم (غلظت اسپرم) در گروه موفق  $70/4 \pm 160/3$  میلیون در سی‌سی و در گروه ناموفق  $82/1 \pm 100/9$  میلیون در سی‌سی بود و دو گروه از لحاظ غلظت اسپرم تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

شکل طبیعی اسپرم در گروه موفق  $21/1 \pm 8/6$  درصد و در گروه ناموفق  $13/8 \pm 21/86$  درصد بود و دو گروه تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. تحرک تام در گروه موفق  $12/3 \pm 92/1$  درصد و در گروه ناموفق  $16/6 \pm 86/05$  بود و دو گروه، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. دو گروه از لحاظ تحرک کلاس A و A + B اختلاف آماری معنی‌دار داشتند ( $P < 0/050$ ) و میزان هر دو مورد در گروه موفق بیشتر بود (جدول ۳).

قابل ذکر است که به دنبال انجام فراوری بر روی مایع منی، برخی نتایج در جهت بهبود پارامترهای اسپرمی در هر دو گروه موفق و ناموفق مشاهده گردید، از جمله افزایش معنی‌دار ( $P < 0/050$ ) درصد تحرک اسپرم‌های کلاس A (اسپرم‌های با حرکت سریع رو به جلو)، همچنین کاهش معنی‌دار ( $P < 0/050$ ) درصد اسپرم‌های با حرکت کند رو به جلو.

درصد اسپرم‌های با حرکت درجا نیز کاهش نشان داد، اما درصد اسپرم‌های بدون حرکت افزایش داشت و هر دوی این موارد از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/050$ ). تغییر درصد تحرک کلاس A + B (اسپرم‌های با حرکت سریع رو به جلو + اسپرم‌های با حرکت کند رو به جلو) نیز پس از فراوری از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. به دنبال انجام فراوری، غلظت

اسپریم‌های متحرک) مایع انزالی در پیش‌بینی موفقیت از اهمیت برخوردار است. سن زن نیز در پیش‌بینی نتیجه با ارزش است (۲۵). Miller و همکاران نیز نتیجه‌گیری کردند که شمارش تام سلول‌های متحرک پس از فراوری نمی‌تواند میزان موفقیت را پیش‌بینی کند، اما اگر این تعداد کمتر از ۱۰ میلیون باشد، میزان موفقیت به طور معنی‌داری کمتر است (۲۶).

Yalti و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که شمارش تام سلول‌های متحرک، میزان تحرک تام و تحرک کلاس A در پیش‌بینی میزان موفقیت تأثیرگذار هستند. افرادی که میزان تحرک تام اسپرم‌ها در آن‌ها ۳۰ درصد یا بیشتر است، از شانس موفقیت بیشتری به نسبت کسانی که این میزان در آن‌ها کمتر از ۳۰ درصد است، برخوردارند (۲۱).

Wainer و همکاران به بررسی اثر شمارش تام سلول‌های متحرک و نیز شکل اسپرم بر میزان موفقیت این روش‌ها پرداختند. آن‌ها نشان دادند در افرادی که شمارش تام سلول‌های متحرک کمتر از ۱۰ میلیون است، میزان موفقیت به طور معنی‌داری کمتر از افرادی است که شمارش تام سلول‌های متحرک بیشتر از ۲۰ میلیون است. آن‌ها همچنین به این نتیجه رسیدند که شکل اسپرم به تنهایی عامل مهمی در موفقیت نمی‌باشد (۲۷).

Badawy و همکاران در یک مطالعه‌ی آینده‌نگر، به بررسی اثر تعداد اسپرم متحرک و شکل اسپرم بر موفقیت IUI پرداختند و نشان دادند که اگر شمارش تام سلول‌های متحرک کمتر از ۵۰ میلیون و یا میزان اشکال طبیعی کمتر از ۳۰ درصد باشد، شانس موفقیت کمتر است (۲۸).

Freour و همکاران نیز نشان دادند که غلظت تام

انجام شد تا با استفاده از نتایج حاصل، بتوان در جهت بهبود عملکرد و ارتقای سطح کیفی کار و در نتیجه درمان کارآمدتر بیماران نابارور اقدام نمود.

تاکنون مطالعات زیادی در زمینه‌ی سن خانم‌ها انجام و مشخص شده است که پذیرش رحم (۲۲) (A۲۲) و کیفیت تخمک (۲۳) با افزایش سن کاهش می‌یابند.

در مطالعه‌ی گذشته‌نگری که توسط زاده‌مدرس و همکاران صورت گرفته است نیز، بین سن زنان و میزان موفقیت ارتباط معنی‌داری وجود داشته است؛ به گونه‌ای که افزایش سن به طور معکوس با میزان موفقیت مرتبط بود. آن‌ها نشان دادند که میزان حاملگی خانم‌هایی که کمتر از ۳۰ سال سن دارند و مدت ناباروری آن‌ها حدود ۴ سال می‌باشد، تا ۲۲ درصد افزایش می‌یابد. علاوه بر این، میان شمارش تام و غلظت اسپرم با این میزان موفقیت، ارتباط معنی‌داری یافت نشده است. در این مطالعه سایر پارامترهای منی نیز ارتباط معنی‌داری با میزان موفقیت این روش نداشتند (۷).

طی مطالعه‌ی Demir و همکاران، مشخص شد که سن زن و مرد، همچنین شکل و تعداد کل اسپرم‌های متحرک در موفقیت یا عدم موفقیت این روش‌ها اثر دارد (۱۵). همچنین Bellver و همکاران نشان دادند که سن پدر ارتباطی با این میزان موفقیت ندارد (۲۴).

Shulman و همکاران در یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر نشان دادند که در بین پارامترهای منی، تنها میزان تحرک تام اسپرم پس از آماده‌سازی تا حدی با نتیجه‌ی باروری موفق همبستگی دارد (۲۰). در مطالعه‌ی گذشته‌نگر دیگری، Van Voorhis و همکاران به این نتیجه رسیدند که در بین پارامترهای منی، تنها شمارش تام سلول‌های متحرک (تعداد کل

و همکاران (۳۰) بود؛ اما با نتایج تحقیقات Van Voorhis و همکاران (۲۵)، Demir و همکاران (۱۵)، Yalti و همکاران (۲۰) و نیز Merviel و همکاران (۳۱) همسویی نداشت.

از لحاظ تحرک کلاس A + B، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه یافت نشد که این یافته همسو با نتایج پژوهش‌های زاده‌مدرس و همکاران (۷) و نیز Haim و همکاران (۳۰) بود، اما با نتایج مطالعات Shulman و همکاران (۲۰) و Freour و همکاران (۲۹) همسویی نداشت.

از لحاظ تحرک کلاس A، مطالعه‌ی حاضر اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد که این یافته، همسو با نتایج مطالعه‌ی زاده‌مدرس و همکاران (۷) بود، اما با یافته‌های مطالعات دیگر همخوانی نداشت (۲۹، ۳۲، ۲۱).

از لحاظ شکل طبیعی اسپرم، مطالعه‌ی حاضر اختلاف معنی‌داری در دو گروه نشان نداد که این یافته، همسو با مطالعات دیگر بود، اما در تعدادی از مطالعات، نتایج بر خلاف یافته‌های ما بود (۳۳، ۱۵). این مطالعه نشان داد که آنالیز مرسوم مایع منی در چارچوب معمول، نمی‌تواند پیش‌بینی‌کننده‌ی نتایج باشد. از سن زن و سن شوهر نیز نمی‌توان در پیش‌بینی نتایج استفاده کرد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که افزایش مدت ناباروری بر روی میزان موفقیت حاملگی تغییری اعمال نمی‌نماید. این مورد با نتایج مطالعه‌ی Tomlinson و همکاران (۳۴) مغایرت دارد؛ اما با نتایج مطالعه‌ی Haney و Dodson (۳۵) مطابقت دارد. در مقایسه‌ی روش‌ها، در مجموع روش IUI به بیمارانی که مدت ناباروری آن‌ها طولانی است،

و شمارش تام اسپرم‌های متحرک، بر میزان موفقیت این روش‌ها تأثیرگذار نیست؛ اما میزان تحرک تام و تحرک کلاس A در گروهی که باردار شده‌اند، به میزان معنی‌داری بیش از گروه ناموفق است (۲۹). در مطالعه‌ی Haim و همکاران، نشان داده شد که بین شمارش تام اسپرم، غلظت، تحرک تام و شمارش تام سلول‌های متحرک با میزان موفقیت ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (۳۰). نتایج مطالعه‌ی Merviel و همکاران نشان داد که بین شمارش تام سلول‌های متحرک و موفقیت، همبستگی مثبت وجود دارد (۳۱).

طی بررسی نتایج حاصل از انجام روش‌های کمک باروری در مطالعه‌ی حاضر، در مجموع میان دو گروه باروری موفق و غیر موفق از لحاظ میانگین سن زن، اختلاف معنی‌داری دیده نشد که این یافته با نتایج برخی مطالعات همسویی نداشت (۷، ۱۵، ۲۵). همچنین سن شوهران در دو گروه باروری موفق و ناموفق مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که اختلاف معنی‌داری وجود ندارد که این یافته، بر خلاف نتایج مطالعه‌ی Bellver و همکاران (۲۴) و همسو با نتایج مطالعه‌ی Demir و همکاران (۱۵) است.

از لحاظ غلظت اسپرم، مطالعه‌ی حاضر اختلاف معنی‌داری بین دو گروه نشان نداد که این یافته همسو با یافته‌های مطالعات Shulman و همکاران (۲۰)، Van Voorhis و همکاران (۲۵)، زاده‌مدرس و همکاران (۷)، Freour و همکاران (۲۹)، Haim و همکاران (۳۰) و سایر مطالعات است.

از لحاظ تعداد کل اسپرم‌های متحرک، مطالعه‌ی حاضر اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد که این یافته، همسو با نتایج مطالعات Miller و همکاران (۲۶)، Freour و همکاران (۲۹) و نیز Haim

توصیه نمی‌شود (۳۶).

در ارزیابی علت ناباروری، مشخص گردید که تفاوت در میزان حاملگی در زنانی که آندومتريوز داشتند، در مقایسه با زنانی که علت ناباروری آنها ناشناخته بود، از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. این یافته بر خلاف سایر مطالعات انجام گرفته در این زمینه می‌باشد و تأثیر منفی آندومتريوز در میزان موفقیت حاملگی توسط محققین گزارش شده است (۳۶). عواملی که در آندومتريوز باعث کاهش باروری می‌شوند، هنوز هم ناشناخته مانده‌اند. آندومتريوز، باعث تغییر محیط فولیکول، کاهش کیفیت تخمک و کاهش میزان لانه‌گزینی می‌شود (۳۷-۳۸).

به نظر می‌رسد در ناباروری با علت ناشناخته، تحریک تخمدان و سپس انجام IUI روش مؤثری است. در ضمن، کاهش میزان موفقیت حاملگی در موارد وجود فقط یک فولیکول، بیانگر آن است که بهتر است تحریک تخمدان و IUI با هم انجام شوند (۳۹).

Peterson و همکاران بیان نمودند که میانگین میزان موفقیت حاملگی در ناباروری با علت ناشناخته، با استفاده از HMG/IUI (Human menopausal gonadotrophin/ Intrauterine insemination) حدود ۱۸ درصد می‌باشد (۴۰) که نزدیک به نتایج این مطالعه است.

مطابق با نتایج مطالعه‌ی اخیر، صباغیان و همکاران (۴۱) بیان نمودند که بین پارامترهای اسپرم و نتیجه‌ی روش‌های کمک باروری، هیچ‌گونه ارتباطی وجود ندارد. این در حالی است که در برخی مطالعات دیگر، بین پارامترهای اسپرم و میزان موفقیت این روش‌ها ارتباط مؤثری وجود داشته است و هر چه

تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها نامطلوب‌تر باشد، شانس موفقیت روش‌های کمک باروری هم کاهش می‌یابد (۴۲).

لازم به ذکر است که شمارش اسپرم به تنهایی، یک شاخص کامل جهت ارزیابی باروری محسوب نمی‌شود؛ چرا که گاهی علت ناباروری، نواقص بیوشیمیایی در ساختار اسپرم‌ها می‌باشد که در آزمایش‌های معمول اسپرم‌گرام تشخیص داده نمی‌شود. خصوصیات مورفولوژیک اسپرم نیز از عوامل مهم دیگر است؛ چرا که مشخص شده است، اسپرم‌هایی که دارای نواقص در ناحیه‌ی سر و یا دم می‌باشند، قادر به بارور کردن تخمک نیستند (۴۳-۴۴).

### نتیجه‌گیری

به دنبال انجام این تحقیق، میزان موفقیت روش‌های کمک باروری در مرکز درمان ناباروری شهید بهشتی شهر اصفهان در ۶ ماهه‌ی اول سال ۱۳۹۲، ۲۳/۹۴ درصد گزارش گردید که در مقایسه با سایر آمارهای مشابه قابل قبول است. همچنین مشخص شد که عواملی از جمله سن بیماران، مدت زمان ناباروری و پارامترهای اسپرم، نمی‌توانند به طور قطع پیش‌بینی‌کننده‌ی نتایج انجام روش‌ها باشند. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که آنالیز مرسوم منی در چارچوب معمول، به تنهایی نمی‌تواند پیش‌بینی‌کننده‌ی نتایج استفاده از روش‌های کمک باروری باشد و نیازمند استفاده از تست‌های پیشرفته‌تر و دقیق‌تر در این زمینه هستیم. از طرفی، با توجه به وجود یک سری ارتباطات میان برخی پارامترهای اسپرمی و میزان موفقیت روش‌های لقاح خارج از رحم در برخی مطالعات، نیاز به انجام آزمایش‌های عملکرد اسپرم و ارزیابی



کروماتین آن به وضوح احساس می‌شود.

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، استادان گروه زنان و زایمان و همچنین پرسنل مرکز درمان ناباروری اصفهان تشکر و قدردانی می‌شود.

### تشکر و قدردانی

از همکاری استادان محترم گروه علوم تشریحی

### References

1. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002; 77(5): 873-82.
2. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006; 85(3): 629-34.
3. Duran HE, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update* 2002; 8(4): 373-84.
4. Kalra SK, Barnhart KT. In vitro fertilization and adverse childhood outcomes: what we know, where we are going, and how we will get there. A glimpse into what lies behind and beckons ahead. *Fertil Steril* 2011; 95(6): 1887-9.
5. Sigman M. Therapeutic insemination. In: Sciarra J, editor. *Gynecology and obstetrics*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. vol 67. p. 7-8.
6. Jarvela IY, Tapanainen JS, Martikainen H. Improved pregnancy rate with administration of hCG after intrauterine insemination: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 18.
7. Zadehmodarres S, Oladi B, Saeedi S, Jahed F, Ashraf H. Intrauterine insemination with husband semen: an evaluation of pregnancy rate and factors affecting outcome. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26(1): 7-11.
8. Gibbs RS, Karlan BY, Haney AF, Nygaard IE. *Danforth's obstetrics and gynecology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2008.
9. Sunderam S, Chang J, Flowers L, Kulkarni A, Sentelle G, Jeng G, et al. Assisted reproductive technology surveillance --- United States, 2006. *MMWR Surveill Summ* 2009; 58(SS05): 1-25.
10. Sunderam S, Kissin DM, Flowers L, Anderson JE, Folger SG, Jamieson DJ, et al. Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2009. *MMWR Surveill Summ* 2012; 61(7): 1-23.
11. Nuojuua-Huttunen S, Tomas C, Bloigu R, Tuomivaara L, Martikainen H. Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod* 1999; 14(3): 698-703.
12. Gezginc K, Gorkemli H, Celik C, Karatayli R, Cicek MN, Olakoglu MC. Comparison of single versus double intrauterine insemination. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008; 47(1): 57-61.
13. Demiroglu A, Gurgan T. Comparison of different gonadotrophin preparations in intrauterine insemination cycles for the treatment of unexplained infertility: a prospective, randomized study. *Hum Reprod* 2007; 22(1): 97-100.
14. Freour T, Jean M, Mirallie S, Langlois ML, Dubourdieu S, Barriere P. Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm. *Int J Androl*. 2009; 32(5): 498-504.
15. Demir B, Dilbaz B, Cinar O, Karadag B, Tasci Y, Kocak M, et al. Factors affecting pregnancy outcome of intrauterine insemination cycles in couples with favourable female characteristics. *J Obstet Gynaecol* 2011; 31(5): 420-3.
16. Jahanian M, Khadem N, Mousavifard N, Torabizadeh A, Vahid-Roudsari F, Yousefi Z, et al. The correlation between total normal motile sperm and Pregnancy outcome after Intrauterine Insemination. *J Reprod Fertil* 2001; 2(6): 48-53. [In Persian].
17. Berry CW, Brambati B, Eskes TK, Exalto N, Fox H, Geraedts JP, et al. The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1995; 10(6): 1516-20.
18. Mehrafza M, Nobakhti N, Atrkar Roushan Z, Dashtdar H, Oudi M, Hosseini A. The correlation between semen parameters and pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Iran J Reprod Med* 2003; 1(1): 29-32.
19. Chung PH, Verkauf BS, Mola R, Skinner L, Eichberg RD, Maroulis GB. Correlation between semen parameters of electroejaculates and achieving pregnancy by intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1997; 67(1): 129-32.
20. Shulman A, Hauser R, Lipitz S, Frenkel Y, Dor J, Bider D, et al. Sperm motility is a major determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(6): 381-5.



21. Yalti S, Gurbuz B, Sezer H, Celik S. Effects of semen characteristics on IUI combined with mild ovarian stimulation. *Arch Androl* 2004; 50(4): 239-46.
22. Cano F, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Effect of aging on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity. *Fertil Steril* 1995; 64(3): 584-9.
23. Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA, et al. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod* 1993; 8(9): 1512-7.
24. Bellver J, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(5): 595-604.
25. Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AE, Syrop CH, Rosenthal G, Dawson J. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2001; 75(4): 661-8.
26. Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD, Randolph JF, Christman GM, Smith YR, et al. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology* 2002; 60(3): 497-501.
27. Wainer R, Albert M, Dorion A, Bailly M, Bergere M, Lombroso R, et al. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Hum Reprod* 2004; 19(9): 2060-5.
28. Badawy A, Elnashar A, Eltotongy M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2009; 91(3): 777-81.
29. Freour T, Jean M, Mirallie S, Dubourdiou S, Barriere P. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 149(2): 186-9.
30. Haim D, Leniaud L, Porcher R, Martin-Pont B, Wolf JP, Sifer C. Prospective evaluation of the impact of sperm characteristics on the outcome of intra-uterine insemination. *Gynecol Obstet Fertil* 2009; 37(3): 229-35. [In French].
31. Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril* 2010; 93(1): 79-88.
32. Berker B, Sukur YE, Kahraman K, Atabekoglu CS, Sonmezer M, Ozmen B, et al. Absence of rapid and linear progressive motile spermatozoa "grade A" in semen specimens: does it change intrauterine insemination outcomes? *Urology* 2012; 80(6): 1262-6.
33. Sun Y, Li B, Fan LQ, Zhu WB, Chen XJ, Feng JH, et al. Does sperm morphology affect the outcome of intrauterine insemination in patients with normal sperm concentration and motility? *Andrologia* 2012; 44(5): 299-304.
34. Tomlinson MJ, Amisssah-Arthur JB, Thompson KA, Kasraie JL, Bentick B. Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): statistical model for IUI success. *Hum Reprod* 1996; 11(9): 1892-6.
35. Dodson WC, Haney AF. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril* 1991; 55(3): 457-67.
36. Hassani Bafrani H, Abedzadeh M, Fruzanfard F, Tabasi Z. Effects of patient age, duration and cause of infertility and number of pre-ovulatory follicles on intrauterine insemination outcomes. *Koomesh* 2010; 12(1): 59-65. [In Persian].
37. Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbot WM, Mears J, Wardle PG, et al. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(1): 426-9.
38. Crosignani PG, Walters DE. Clinical pregnancy and male subfertility; the ESHRE multicentre trial on the treatment of male subfertility. *European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod* 1994; 9(6): 1112-8.
39. Hughes EG, Collins JA, Gunby J. A randomized controlled trial of three low-dose gonadotrophin protocols for unexplained infertility. *Hum Reprod* 1998; 13(6): 1527-31.
40. Peterson CM, Hatasaka HH, Jones KP, Poulson AM, Jr., Carrell DT, Urry RL. Ovulation induction with gonadotropins and intrauterine insemination compared with in vitro fertilization and no therapy: a prospective, nonrandomized, cohort study and meta-analysis. *Fertil Steril* 1994; 62(3): 535-44.
41. Sabbaghian M, Modarresi T, Hosseinfar H, Daliri Hampa A, Karimian L, Ghaffari F, et al. Predictive value of semen parameters and age of the couple in pregnancy outcome after Intrauterine insemination. *Tehran Univ Med J* 2013; 71(8): 530-5. [In Persian].
42. Sahakyan M, Harlow BL, Hornstein MD. Influence of age, diagnosis, and cycle number on pregnancy rates with gonadotropin-induced controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1999; 72(3): 500-4.
43. Hwang K, Walters RC, Lipshultz LI. Contemporary concepts in the evaluation and management of male infertility. *Nat Rev Urol*

2011; 8(2): 86-94.  
**44.** Yousefi B, Azargon A. Predictive factors of  
intrauterine insemination success of women

with infertility over 10 years. J Pak Med Assoc  
2011; 61(2): 165-8.

## Evaluation of the Success Rate of Assisted Reproductive Techniques (ART) in Shahid Beheshti Infertility Center, Isfahan, Iran

Roshanak Abutorabi PhD<sup>1</sup>, Vida Razavi MD<sup>2</sup>, Shekufeh Baghazade MSc<sup>3</sup>,  
Laleh Sharegh MSc<sup>4</sup>, Fatemeh Sadat Mostafavi MD, PhD<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Today, usage of assisted reproductive techniques (ART) has been resolved the problem of many infertile couples. Repeated treatment cycles, long time and high cost, problems due to repeated anesthesia, has been directed the researchers to find ways to predict the success rate of each method. This study aimed to evaluate the success of assisted reproductive techniques in Isfahan Shahid Beheshti infertility center, Iran.

**Methods:** In this retrospective study, 71 couples referred to this center for assisted reproductive techniques during the first six months of 2013 were enrolled. The main criterion for a positive result was clinical pregnancy two weeks after embryo transfer. Required information such as age, semen analysis and outcome of assisted reproductive techniques, were obtained from patients' medical records.

**Findings:** Of all couples, 42 cases were treated with intrauterine insemination (IUI) and 29 cases were treated with in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI). 23.8% of IUI cycles and 24.1% of IVF/ICSI cycles were successful. The mean age and duration of infertility in both successful and unsuccessful IUI groups were not statistically significant; while these differences in the cases of IVF/ICSI were significant. In addition, there were no significant differences between the sperm parameters in successful and unsuccessful IUI treated groups; but in IVF/ICSI treated group, we found significant differences in the percent of fast motile sperms between successful and unsuccessful groups.

**Conclusion:** Conventional analysis of semen and couple's age cannot predict the outcome of IUI; but the success rate of IVF/ICSI is related to the age of couples, as well as shorter duration of infertility and better semen parameters.

**Keywords:** Infertility, Intrauterine insemination, In-vitro fertilization, Intracytoplasmic sperm injection, Sperm parameters

**Citation:** Abutorabi R, Razavi V, Baghazade Sh, Sharegh L, Mostafavi FS. **Evaluation of the Success Rate of Assisted Reproductive Techniques (ART) in Shahid Beheshti Infertility Center, Isfahan, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(306): 1767-81

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences AND Infertility Laboratory, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran

2- Gynecologist, Department of Infertility, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran

3- Infertility Laboratory, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran

4- Department of Infertility, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran

5- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences AND Infertility Laboratory, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Fatemeh Sadat Mostafavi MD, PhD, Email: fs.mostafavi@gmail.com

## مروری بر علل مغایرت گروه‌بندی مستقیم و معکوس سیستم ABO، توزیع فراوانی این عوامل در ایران و جهان و راهکارهای مرتفع‌سازی

نرگس سیفی‌زاده<sup>۱</sup>، نیر سیفی‌زاده<sup>۲</sup>، دکتر مجید فرش‌دوستی حق<sup>۳</sup>

### مقاله مروری

#### چکیده

**مقدمه:** تعیین گروه خونی ABO، مهم‌ترین آزمایشی است که قبل از انتقال خون باید انجام گیرد. انتقال خون با گروه‌های خونی ناسازگار از نظر ABO، می‌تواند به واکنش‌های حاد همولیتیک، بیماری‌های بدخیم و در موارد کنترل نشده و شدید، به مرگ و میر منجر شود.

**روش‌ها:** گروه‌بندی مستقیم یا سلولی (بررسی آنتی‌ژن‌های سطح گلبول‌های قرمز) و گروه‌بندی غیر مستقیم یا سرمی (بررسی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم) از جمله شایع‌ترین آزمایش‌هایی هستند که امروزه برای تعیین گروه خونی افراد در آزمایشگاه‌ها به صورت روزانه انجام می‌شوند. تفسیر نتایج حاصل از آزمایش‌های سلولی و سرمی دارای اهمیت بسیار می‌باشد و در صورت عدم تطابق نتایج این دو آزمایش، باید قبل از گزارش، آزمایش‌های تکمیلی انجام شود و در صورت نیاز فوری به تزریق خون، باید از گلبول‌های قرمز گروه O جهت انتقال خون استفاده شود. هدف از این مقاله مروری، جمع‌بندی کلی از علل دخیل در مغایرت نتایج آزمایش سرمی و سلولی و ارایه‌ی راهکارهای ممکن برای حل این مشکل و همچنین بررسی و مقایسه‌ی تعدادی از موارد معدود بررسی شده در ایران در این زمینه است.

**نتیجه‌گیری:** عوامل انسانی در دنیا و عوامل ذاتی در ایران، به عنوان مهم‌ترین عوامل مؤثر بر مغایرت گروه‌بندی مستقیم و معکوس سیستم ABO گزارش شده‌اند. این موضوع، نشان از تفاوت‌هایی بنیادی در فراوانی این عوامل در ایران نسبت به سایر کشورها دارد. شناخت عوامل مؤثر بر این تفاوت‌ها، گامی مهم در راستای ارتقای کیفی سامانه‌ها و فرایندهای اهدا و انتقال خون است و نیازمند بررسی‌های بومی گسترده، مداوم و جدی در ایران می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** تعیین گروه خونی ABO، انتقال خون ناسازگار، آزمایش‌های سلولی و سرمی

**ارجاع:** سیفی‌زاده نرگس، سیفی‌زاده نیر، فرش‌دوستی حق مجید. مروری بر علل مغایرت گروه‌بندی مستقیم و معکوس سیستم ABO، توزیع فراوانی این عوامل در ایران و جهان و راهکارهای مرتفع‌سازی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۶): ۱۷۹۶-۱۷۸۲

#### مقدمه

آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن A و فردی با گروه خونی A آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن B و فردی با گروه خونی O هر دو آنتی‌بادی را در سرم خود دارند (۱) (شکل ۱). آنتی‌ژن‌های ABO ساختارهای کربوهیدراتی پیچیده‌ای دارند که نه تنها بر سطح گلبول‌های قرمز بلکه در ترشحات و همچنین روی

آنتی‌بادی‌های ABO جزء آنتی‌بادی‌های غالب طبیعی بدن محسوب می‌شوند و به طور معمول، در سرم افرادی که آن آنتی‌ژن خاص از ABO را روی گلبول‌های قرمز خود بیان نمی‌کنند، ظاهر می‌شوند؛ به این صورت که فردی با گروه خونی B

۱- کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

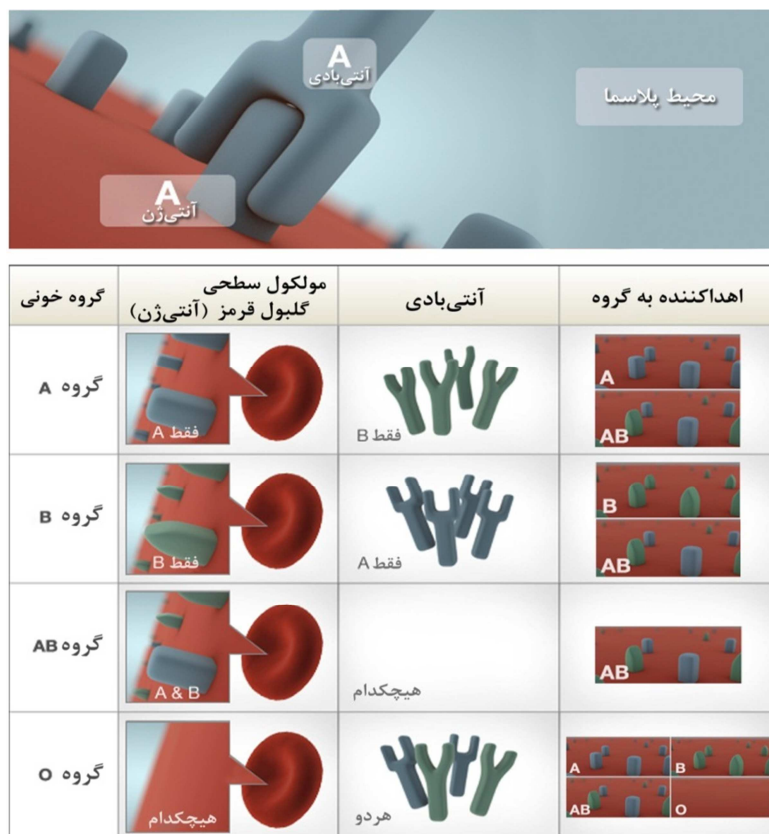
۲- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی و آزمایشگاه‌ها، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی بند ناف، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار، گروه آزمایشگاه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

(۲). یکی از معمول‌ترین آزمایش‌های قبل از انتقال خون، گروه‌بندی ABO می‌باشد. برای افزایش دقت نتایج گروه‌بندی ABO، در یک زمان هم آزمایش گلبول‌های قرمز برای آنتی‌ژن‌ها (روش مستقیم) و هم آزمایش سرم برای تشخیص آنتی‌بادی‌ها (روش غیر مستقیم یا معکوس) انجام می‌گیرد و طبق قانون Landsteiner باید نتایج این دو آزمایش همخوانی داشته باشند (۲). عدم تطابق گروه‌بندی ABO زمانی اتفاق می‌افتد که نتیجه‌ی آزمایش سلولی و سرمی یکسان نباشد (۵). تنها زمانی می‌توان از گروه‌بندی سلولی یا سرمی به تنهایی استفاده نمود که هدف کنترل گروه خونی پلاسما یا کیسه‌ی خون باشد (۶).

برخی از سلول‌های اپی‌تلیال مثل ناخن دیده می‌شوند (۲). اهمیت فیزیولوژی آنتی‌بادی‌های طبیعی به صورت مبهم باقی مانده است. هر چند پذیرفته شده است که آنتی‌بادی‌های طبیعی ABO یک نوع دفاع غیر اختصاصی علیه باکتری‌ها هستند و تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی نیز محسوب می‌شوند (۳).

آنتی‌بادی‌های ABO اغلب از نوع IgM (Immunoglobulin M) می‌باشند، در حالی که بعد از آلوایمونیزاسیون در دوران بارداری یا انتقال خون ناسازگار از لحاظ ABO، آنتی‌بادی‌هایی با ایزوتایپ ایمونوگلوبولین G دیده می‌شوند (۴). سیستم تعیین گروه‌خونی ABO هم برای انتقال خون و هم برای شناسایی افراد در تحقیقات جنایی بسیار مهم می‌باشد



شکل ۱. طرح شماتیک و کلی گروه‌های خونی در سیستم ABO، توزیع آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها در آنان و معرفی گروه‌های خونی گیرنده از هر گروه خونی خاص

طبق بررسی‌های Chiaroni و همکاران، رخداد عدم تطابق گروه‌بندی ABO در فرانسه، ۱ در ۳۴۰۰ فرد می‌باشد (۷). در صورت عدم تطابق نتایج سرمی و سلولی، نتایج گروه‌بندی ABO نیز قابل تفسیر نخواهند بود و به دنبال آن، اگر گروه خونی فرد دهنده یا گیرنده‌ی خون به درستی تعیین نشود، منجر به واکنش‌های نامطلوب ناشی از ناسازگاری‌های انتقال خون می‌گردد (۸). از آن جایی که آنتی‌بادی‌هایی که علیه آنتی‌ژن‌های ABO ساخته می‌شوند، از نوع IgM هستند، توانایی بالایی برای فعال کردن کمپلمان دارند و واکنش‌های همولیز را در بدن به دنبال خواهند داشت و در ۴۰ درصد موارد، به مرگ گیرنده‌ی خون ختم می‌شوند (۱۰-۹، ۲). خطر واکنش‌های ایمنوهمولایتیک مربوط به تزریق‌های اشتباه با ناسازگاری ABO حدود ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیش از عفونت‌های ویروسی می‌باشد (۷). هر چند روش لوله‌ای به جای اسلایدی، در مراکز بانک خون و بیمارستان‌ها به صورت متداول برای گروه‌بندی سیستم ABO به کار برده می‌شود (۱۱)، اما گاهی عدم تطابق آزمایش سلولی و سرمی حادث می‌شود (۱۲-۹، ۲). در این مواقع، قبل از اقدام جهت آزمایش‌های پرهزینه‌تر و تحقیقات بیشتر، باید اول از خطاهای تکنیکی و شخصی اطمینان حاصل شود (۱۳-۱۴). در صورت رد این خطاهای تکنیکی و شخصی، می‌توان روی علت‌های ذاتی که به سرم و گلوبول‌های قرمز برمی‌گردند، تمرکز نمود (۱۲، ۹).

اولین مورد عدم تطابق در گروه‌بندی ABO، مربوط به بروز ضعیف آنتی‌ژن A در برخی از اعضای یک خانواده‌ی آلمانی با گروه خونی A و AB می‌باشد. پس از آن نیز مواردی در لوسمی‌ها و

عفونت‌های حاد باکتریال و مصرف داروها گزارش شد (۱۶-۱۵). از جمله عوامل ذاتی که می‌توانند موجب عدم تطابق نتایج آزمایش‌های سلولی و سرمی شوند، می‌توان به انواع سپتیمی‌ها و بیماری‌های بدخیم که موجب ترشح آنتی‌ژن می‌شوند، گروه‌های خونی نادر مثل فنوتیپ بمبئی و گروه خونی Ax، وجود آنتی A<sub>۱</sub> در سرم افراد با گروه خونی A<sub>۲</sub> و A<sub>۲</sub>B، پلاسمافریزیس، کیمریسم (انتقال خون، پیوند مغز استخوان)، پلی‌اگلو تیناسیون، آنتی‌ژن B اکتسابی، آزمون کمبس مستقیم +، اتواگلو تیناسیون توسط اتوآنتی‌بادی‌های سرد، سن بیمار (کهولت، نوزادی)، هیپوگاماگلوبولینمی، آنتی‌بادی‌های آلاینده در معرف، ژل و ارتون، رولو، پدیده‌ی پروزن، بیان ضعیف آنتی‌ژن‌های ABO، زیر گروه‌های ABO، ترکیبات گروه خونی اضافی، هم‌پوشانی فعالیت گلیکوزیل ترانسفرازها، علت‌های ژنوتیپی که تا به حال در ایران بررسی نشده است و غیره اشاره کرد (۱۵-۱۲، ۱۰-۹، ۲).

برای اثبات مغایرت بین گروه‌بندی سلولی و سرمی به طور مثال می‌توان از روش‌هایی همچون آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی، روش‌های جذب و آلوژن، تکرار آزمایش‌ها در دماهای پایین (۴ °C)، کمبس مستقیم، غربالگری آنتی‌بادی‌های ناخواسته و اتوکنترل بر اساس استاندارد بانک خون، استفاده نمود تا علت دقیق عدم تطابق مشخص شود (۱۸-۱۷، ۱۲، ۲) که البته انتخاب روش مناسب، بر اساس پیش‌ارزیابی اولیه‌ی نتایج گروه‌بندی انجام خواهد شد که در بخش‌های آتی معرفی می‌گردند.

شستن گلوبول‌های قرمز با محلول سالین به طور معمول می‌تواند عدم تطابق گروه‌بندی ABO را رفع

طبق بررسی‌های Chiaroni و همکاران، از بیش از ۴۰۰ هزار نمونه‌ی خون‌گیری شده در ۳۵ بیمارستان کشور فرانسه، بیشترین عامل عدم تطابق گروه‌بندی ABO به خطاهای خون‌گیری نسبت داده شده است. بر اساس همان تحقیق، دومین عامل مهم در عدم تطابق، خطاهای دفتری در حین وارد کردن اطلاعات بیماران می‌باشد (۷). در گزارشی دیگر، ۳۷ درصد از همه‌ی تزریقات اشتباه که در USA منجر به مرگ می‌شود، مربوط به عدم تطابق گروه‌بندی ABO اعلام گردیده است (۲۲)، که خطاهای انسانی مسئول ۵۰ درصد این موارد گزارش شده است (۲۳، ۱۹). در عدم تطابق گروه‌بندی مستقیم و غیر مستقیم قبل از این که به عوامل ذاتی در مغایرت توجه شود، باید خطاهای تکنیکی لحاظ شوند که در صورت لزوم برای رفع این خطاها آزمایش تکرار شود. در غیر این صورت، علل دیگر عدم تطابق بررسی شوند. در کنار این‌ها، داشتن اطلاعات اضافی از سوابق سرولوژیکی - پزشکی بیمار (سن، سوابق بارداری، سوابق انتقال خون، داروهای مصرف شده و نتایج آزمایش‌های سرولوژیکی سابق) در یافتن دقیق و سریع علت مغایرت گروه‌بندی سلولی و سرمی مهم می‌باشد. در جدول ۱ به بخشی از این خطاها به صورت اجمالی اشاره می‌شود (۲).

عامل خطای انسانی عاملی به ظاهر ساده و قابل اغماض است و به خصوص در فرایندهای منجر به فوت بیمار، توجه کمتری به آن می‌گردد. این در حالی است که شیوع این خطا حتی در سامانه‌های پیشرفته‌ی پزشکی کشورهای اروپایی و آمریکایی جایگاه عامل اول در عدم تطابق گروه‌بندی ABO را به خود اختصاص داده است. هر چند که بر اساس

کند. این در صورتی است که آزمایش روی گلبول‌های قرمز معلق در سرم یا پلاسما انجام شده باشد (۲۰). شیوه‌های مکمل آزمایشگاهی زیر نیز برای تشخیص گروه خونی ABO به کار برده می‌شود:

۱- در روش مستقیم گروه‌بندی ABO، علاوه بر آنتی A و آنتی B از آنتی AB که قدرت واکنش قوی‌تری از آنتی A به تنهایی دارد، استفاده می‌شود و در موارد ضروری، برای تعیین گروه‌های ضعیف‌تر A از آنتی H و آنتی A1 استفاده می‌شود (۲۱).

۲- در روش گروه‌بندی غیر مستقیم ABO، علاوه بر سوسپانسیون ۴-۶ درصد سلولی A و B، از سوسپانسیون سلولی A1 و A2 و O برای تعیین گروه‌های ضعیف A یا B و فنوتیپ بمبئی استفاده می‌شود (۱۷).

۳- انجام آزمایش‌هایی برای مشخص کردن آنتی‌ژن ABH در بزاق و سرم افراد مترشحه که به تعیین و تأیید گروه‌های خونی A یا B کمک می‌کند (۱۳).

۴- از مخلوط سرم و سلول خود بیمار برای انجام آزمایش‌های اتوکترول استفاده می‌شود تا مورد اتواگلوتینین‌ها که از مورد گروه‌های ضعیف اکتسابی یا فنوتیپ بمبئی شایع‌تر می‌باشد، تشخیص داده شود (۶).

۵- آزمایش‌های جذب و آلوژن به عنوان آزمایش‌های تکمیلی برای اطمینان از گروه خونی افراد مشکوک انجام می‌شود (۱۳).

### خطاهای تکنیکی

پس از مروری اجمالی بر ادبیات این حوزه و معرفی عوامل عدم تطابق نتایج آزمایش‌های سلولی و سرمی، به توضیح و تفسیر هر یک از عوامل، میزان فراوانی آن‌ها و ارایه‌ی راهکارهای پیشنهادی پرداخته می‌شود.



چنین مواردی انجام می‌گیرد، تکرار آزمایش‌های تعیین گروه خونی با انکوباسیون‌های طولانی مدت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  می‌باشد (چون آنتی‌ژن‌های ABO در دماهای پایین واکنش‌های قوی‌تری نشان می‌دهند. علاوه بر این، اتوکنترل و غربال آنتی‌بادی‌ها نیز باید انجام گیرد که اتوآنتی‌بادی‌ها و آلوآنتی‌بادی‌ها حذف شوند و در تکرار آزمایش‌ها نتیجه‌ی مثبت کاذب ندهند. انکوباسیون‌های طولانی مدت در هوای سرد و همچنین مجاورت گلوبول‌های قرمز با آنزیم، از جمله راهکارهایی است که برای رفع این علت از علل عدم تطبیق گروه‌بندی سلولی و سرمی انجام می‌گیرند (۲).

### ۳. ترکیبات اضافی گروه خونی

گاهی وجود ترکیبات خاص گروه خونی مثل آنتی‌ژن‌های محلول ABO موجود در سرم یا پلاسما و یا وجود آنتی‌بادی‌های آگری‌فلاوین (که در کارسینوماها یا مسدود شدن دستگاه گوارش دیده می‌شود)، باعث عدم تطابق نتایج آزمایش سلولی و سرمی می‌شود که می‌تواند به علت شسته نشدن سلول‌های خونی بیمار باشد. در این مورد، یک بار شستشوی سلول‌ها با سالی‌ن نرمال و تهیه‌ی مجدد سوسپانسیون طبق دستورالعمل‌های دفترچه‌ی راهنما، می‌تواند به حل مشکل کمک کند (۲).

بررسی‌های محدود انجام شده در ایران، این عامل فراوانی کمتری نسبت به سایر عوامل ذاتی دارد (۲۴-۲۵)، که مقایسه‌ی این آمار با آمارهای جهانی نیاز جدی به کار میدانی و بررسی‌های بلند مدت و مستقل دارد.

## عوامل ذاتی

### ۱. زیر گروه‌های ABO

در این نوع عدم انطباق، در روش مستقیم گروه خونی به صورت O تعیین می‌گردد و گروه‌بندی غیر مستقیم گروه خونی A یا B را نشان می‌دهد و تفسیر اشتباه به خاطر عدم تشخیص درست آنتی‌ژن‌های ضعیف A یا B می‌باشد. برای تشخیص آنتی‌ژن‌های ضعیف و زیر گروه‌های ABO از روش جذب و آلویشن استفاده می‌کنند (۲). در یک بررسی انجام گرفته در شهر تهران، از بین زیر گروه‌های ABO، شیوع زیر گروه خونی A از سایر زیر گروه‌ها بیشتر بود و فراوانی زیر گروه‌های B و AB به طور تقریبی مشابه گزارش شد (۲۴).

### ۲. بیان ضعیف آنتی‌ژن‌های ABO

بیان ضعیف آنتی‌ژن‌های ABO در برخی از بیماری‌های مزمن دیده می‌شود که در تعیین گروه خونی فرد اختلال ایجاد می‌کند. اولین کاری که در

جدول ۱. فهرستی از خطاهای خون‌گیری

اشکالات موجود در وسایل و تجهیزات و معرفیها	خطاهای دستی و دفتری
استفاده از معرف‌های تاریخ گذشته	شناسایی نادرست بیمار یا نمونه
آلودگی معرف‌ها (مشاهده‌ی تغییر رنگ در معرف‌ها)	برچسب زنی نادرست نمونه‌ی گرفته شده از بیمار
کالیبره نبودن سانتیفریژ، انکوباتور، تایمر، دماسنج و غیره	اشتباه در ثبت نتایج و همچنین وارد کردن نتایج در کامپیوتر
خطاهای دستگاه‌های تنظیم کننده‌ی دما که برای نگهداری معرف‌ها و نمونه‌ها کاربرد دارند	خطاهای نگارشی کارورز در حین ثبت نتایج
استفاده از لوله‌های شیشه‌ای شکسته (حضور ذرات شیشه‌ای بروسلیکات در نمونه در نتایج آزمایش‌ها اختلال ایجاد می‌کند)	خون‌گیری نامناسب (به عنوان مثال استفاده از خون بالای سوند موجب آلودگی نمونه می‌شود)
	پیروی نکردن از دستورالعمل‌های کارخانه‌های سازنده‌ی کیت‌ها

#### ۴. گروه خونی B اکتسابی

پدیده‌ی B اکتسابی اغلب با بدخیمی‌های معده و روده (یا سایر مواردی که تمام دیواره‌ی دستگاه گوارش از بین می‌رود) همراه است. ارگانیس‌های هم‌غذا در لوله‌ی گوارش یا محصولات فرعی متابولیسم آن‌ها، وقتی به جریان خون راه پیدا می‌کنند، آنتی‌ژن‌های سطحی گلبول‌های قرمز را تغییر می‌دهند که در برخی موارد، تفکیک و جداسازی این ارگانیس‌های مشکوک به دخالت در آنتی‌ژن‌های سطحی گلبول‌های قرمز گزارش شده است (۲۶). دو مکانیسم مختلف برای B اکتسابی مطرح شده است. اول این که گفته می‌شود آنزیم‌های باکتریایی، یک سری تغییرات بیوشیمیایی روی پروتئین‌های غشای گلبول‌های قرمز انجام می‌دهند و دوم این که جذب پلی‌ساکاریدهای باکتریایی توسط غشای گلبول‌های قرمز، منجر به ظهور این گروه خونی می‌شود (۲۷).

Marsh در یک بررسی در محیط آزمایشگاهی، احتمال داد که آنتی‌ژن B کاذب به خاطر فعالیت آنزیم‌های باکتریایی باشد (۲۸). Stratton و Renton پیشنهاد کردند که تغییر در گروه خونی ممکن است در اثر جذب پلی‌ساکاریدهای باکتریایی به روی گلبول‌های قرمز باشد (۲۹). این موضوع، با بررسی‌های Williamson و Springer که یک رابطه‌ی سرولوژیکی قوی بین آنتی‌ژن B و O<sub>۸۶</sub> اکلاهی نشان دادند، به اثبات رسید (۳۰). Gerbal و همکاران طی یک بررسی نشان دادند که آنزیم‌هایی مثل داستیلاز باکتریایی می‌تواند N- $\alpha$  استیل D گالاتوزامین را (که قند غالب گروه خونی A می‌باشد) به D- $\alpha$  گالاتوزامین تبدیل کند. D- $\alpha$  گالاتوزامین بسیار شبیه آنتی‌ژن B است و می‌تواند

با آنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن B واکنش متقاطع داشته باشد (۳۱). بیان آنتی‌ژن‌های B روی گلبول‌های قرمز در گروه خون B اکتسابی گذرا است و به صورت واضح با سن و سرطان‌های کلون مرتبط می‌باشد (۳۲).

Giles و همکاران با بررسی تغییرات گروه خونی یک زن ۵۷ ساله که مبتلا به سرطان کلون و متاستاز ریه بود، متوجه شدند که پس از مدتی گروه خونی فرد از A به AB تغییر یافت؛ حال آن که آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن B نیز در سرمش مشهود بود (۳۳). Marsh از واژه‌ی B کاذب برای توصیف گروه خونی یک زن ۶۴ ساله‌ی مبتلا به سرطان کلون استفاده کرد، گروه خونی بیمار AB با بیان ضعیف B بر سطح گلبول قرمز بود و همچنین آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن B نیز در خون بیمار دیده می‌شد که بعد از هفته‌ها، کاهش بیان آنتی‌ژن B در سطح گلبول‌های قرمز در مقایسه با اولین آزمایش‌های گروه‌بندی ABO مشاهده شد. بعدها موارد بیشتری از گروه خون B کاذب یا B اکتسابی گزارش شد که همه‌ی آن‌ها افرادی با گروه خون A را شامل می‌شدند (۲۸).

#### ۵. کایمریسم

کایمریسم به معنی وجود چندین جمعیت سلولی می‌باشد که به دو صورت کایمرای ارثی یا ژنتیکی و کایمرای مصنوعی عنوان می‌شوند. کایمرای ژنتیکی ممکن است در اثر تبادل بافت درون رحمی بین دو قلوهای ناهمسان به وجود آید. ممکن است از نوع کایمرای موزایسمی باشد که یکی از دلایلیش دی‌اسپرمی است. کایمرای مصنوعی می‌تواند در اثر پیوند سلول‌های پیش‌ساز خون، انتقال خون، خونریزی‌های متوالی جنین و مادر و انتقال خون درون رحمی باشد. وجود بیش از یک جمعیت

می‌شود. برای جلوگیری از اثر پروزون، رقیق کردن سرم با سالین نرمال و استفاده از روش‌هایی برای کاهش اثر کمپلمان مثل جمع‌آوری نمونه با EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) پیشنهاد می‌شود (۲).

#### ۷. پدیده‌ی رولو یا رولکسان

پدیده‌ی رولو ممکن است مسؤول واکنش‌های آنتی‌بادی غیر منتظره و آنتی‌ژن‌های غیر منتظره باشد (۱). این پدیده اغلب در بیماران مولتیپل مایلوما یا دیگر اختلالات پروتئین‌های خونی و همچنین در تزریقات مایعاتی با وزن مولکولی بالا مثل فیبرینوژن، دکستران یا هیدرکسی اتیل نشاسته دیده می‌شود. پدیده‌ی رولو یکی از عواملی است که عدم تطابق گروه‌بندی سلولی و سرمی را موجب می‌شود. روش‌های شستشوی سلول‌های خونی با سالین نرمال و همچنین روش جایگزین سالین به سبب تغییر در بار سطحی گلبول‌های قرمز مانع رولکس می‌شود و عدم انطباق نتایج سلولی سرمی را رفع می‌کند (۲). در بیماری مولتیپل مایلوما، سطح گلبولین‌ها افزایش می‌یابد و منجر به رولو می‌شود؛ شکل‌گیری رولو باعث می‌شود که گلبول‌های قرمز به هم بچسبند و مثل سکه روی هم قرار بگیرند و ممکن است که یک فرد تازه‌کار این را آگلوتیناسیون تلقی کند (۱۳-۱۲، ۲) (شکل ۲).

در چنین مواردی، شستشوی مکرر با سرم فیزیولوژیک و سانتریفیوژ، سطح گلبول‌های قرمز را شستشو می‌دهد و به این طریق از پدیده‌ی رولکسان جلوگیری می‌شود و نتایج سل تایپ و بک تایپ یکسان خواهد شد (۳۵). طبق بررسی انجام شده در شهر تهران، سهم این علت از علل مغایرت گروه‌بندی سلولی و سرمی ۵ درصد گزارش شده است (۲۴).

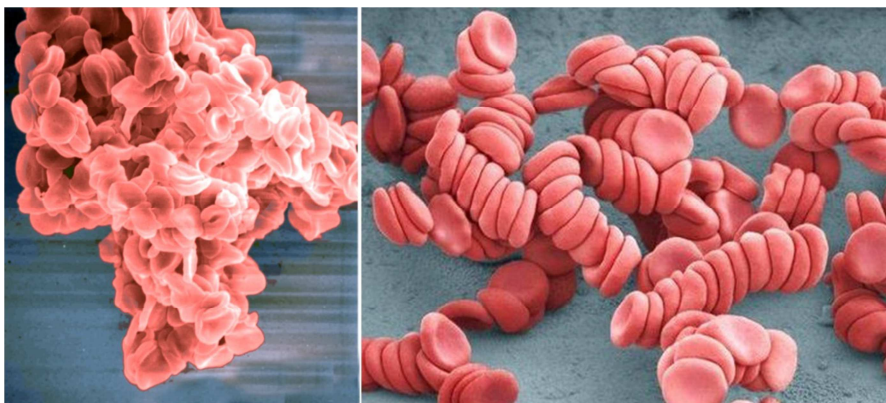
سلولی، چه به صورت ژنتیکی و چه به صورت مصنوعی، منجر به عدم تطابق گروه‌بندی سلولی و سرمی می‌شود (۲).

#### ۶. فقدان یا واکنش‌های ضعیف آنتی‌بادی‌ها

۱-۶. نوزادان: تولید آنتی‌بادی در خون نوزادان، به علت تکامل نیافتن سیستم ایمنی آن‌ها، حداقل تا چهار ماه پس از تولد رخ نمی‌دهد و به همین دلیل، فقدان آنتی‌بادی‌های A و B در نوزادان دیده می‌شود. این موضوع به طور عمومی در تعیین گروه خونی نوزادان اختلال ایجاد می‌کند و منجر به عدم تطابق نتایج آزمایش‌های سلولی و سرمی می‌شود. ذکر این نکته لازم می‌نماید که حتی اگر آنتی‌بادی در خون محیطی یا خون بند ناف نوزادان دیده شود، به احتمال زیاد منشأ مادری دارد (۳۴). برای حل این مشکل، باید از گروه‌بندی معکوس برای تعیین گروه‌خونی نوزادان زیر چهار ماه اجتناب کرد (۲).

۲-۶. افراد مسن: در افراد مسن نیز به علت کاهش تولید آنتی‌بادی، ممکن است که گروه‌بندی مستقیم و معکوس نتیجه‌ی ناهمسانی بدهند. چنین عدم تطابقی در افرادی که شیمی درمانی کرده‌اند و یا سیستم ایمنی ایشان در اثر بیماری، سرکوب یا تخریب شده و قدرت تولید آنتی‌بادی در آن‌ها از بین رفته است، مشاهده می‌گردد. انکوباسیون نمونه‌ها در دمای اتاق (۲۴-۲۰ °C) ممکن است سبب افزایش واکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن شود و همچنین انجام آزمایش سلول‌های غربالی آنتی‌بادی نیز تا حد قابل توجهی به حل موضوع کمک می‌کند (۲).

۳-۶. پروزون: تیترا بالای آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی در تعیین گروه خونی تأثیر می‌گذارد و منجر به عدم تطابق گروه‌بندی سلولی و سرمی



شکل ۲. راست: در پدیده‌ی رولو گلبول‌های قرمز به هم چسبیده و مانند سکه روی هم قرار می‌گیرند؛ چپ: چسبندگی معمولی گلبول‌های قرمز در اثر لختگی برای مقایسه نشان داده شده است.

### ۸. پلی‌اگلوتیناسیون

پدیده‌ای است که در آن گلبول‌های قرمز فرد با سرم یک فرد بالغ اگلوتیناسیون می‌دهد، اما با سرم بند ناف اگلوتیناسیون نمی‌دهد. این نوع سلول‌های خونی، در اثر جهش‌های سوماتیک بافت‌های خون‌ساز یا تغییر در غشای گلبول‌های قرمز به وسیله‌ی آنزیم‌های باکتری یا ویروسی و یا عوامل وراثتی به وجود می‌آیند. گفته شده است که بیشترین علت پلی‌اگلوتیناسیون، عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی می‌باشند که با حذف عامل عفونت، پلی‌اگلوتیناسیون نیز حذف می‌شود. در واقع، آنزیم‌های باکتریایی یا ویروسی با تغییر در پروتئین‌های غشای گلبول‌های قرمز باعث آشکار شدن آنتی‌ژن‌های مخفی می‌شوند که منجر به عدم تطابق گروه‌بندی سلولی و سرمی می‌شود (۲).

### ۹. اتوآنتی‌بادی‌های سرد

وجود اتوآنتی‌بادی‌های سرد و قوی در سرم فرد، باعث می‌شود که حتی بدون افزودن آنتی‌سرم یا هر افزودنی دیگر اگلوتیناسیون رخ دهد که در تعیین گروه‌بندی خونی، اختلال ایجاد می‌کند و نتیجه‌ی کاذب می‌دهد. گرم کردن لوله‌ها در  $37^{\circ}\text{C}$  و چندین

بار شستشوی لوله‌ها با سالین نرمال در  $37^{\circ}\text{C}$ ، در از بین بردن اگلوتیناسیون‌های به وجود آمده در اثر اتوآنتی‌بادی‌های سرد کمک کننده خواهد بود (۲). اتوآنتی‌بادی‌ها بیشتر از نوع آنتی I یا IH هستند که با گلبول‌های قرمز اکثر افراد واکنش می‌دهند. استفاده از اتوکنترل‌ها روش خوبی جهت افتراق اتوآنتی‌بادی‌های سرد و اتوآنتی‌بادی‌های سرد می‌باشد (۳۶، ۴-۲). اتوآنتی‌بادی‌ها سهم کمی (۱/۵ درصد) از کل عوامل در مغایرت گروه‌بندی ABO را به خود اختصاص می‌دهند (۲۴).

### ۱۰. ژل وارنون

ژل وارنون، ژلی غنی از اسید هیالورونیک می‌باشد و سبب اتصال بند ناف به بافت‌ها می‌شود. اگر در حین نمونه‌گیری از خون بند ناف، دقت کافی نشود، این ژل با نمونه مخلوط می‌گردد و چون به صورت خود به خودی سبب تجمع گلبول‌های قرمز می‌شود، در نتیجه‌ی آزمایش‌های گروه‌بندی خونی اختلال ایجاد می‌کند. شستشوی خون بند ناف با سالین نرمال و نمونه‌گیری از ورید بند ناف، این آلودگی را کاهش می‌دهد و به رفع عدم انطباق گروه‌بندی سرمی و سلولی کمک می‌کند (۲).

### ۱۱. آنتی‌بادی‌های آلاینده در معرف‌ها

آلودگی در آنتی‌سرم‌های معرف نیز می‌تواند موجب تناقض در گروه‌بندی سرمی و سلولی شود. به این نحو که گاهی آنتی‌سرم‌های معرف، حاوی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های فرعی روی سطح گلبول‌های قرمز هستند که با آن‌ها واکنش و پاسخ مثبت کاذب را نشان می‌دهند. برای حل این مشکل، بهتر است از معرف‌های کارخانه‌ی دیگری استفاده شود (۲).

### ۱۲. آلوآنتی‌بادی‌ها

آنتی‌بادی‌هایی از کلاس IgM که در دمای اتاق یا دمای بیش از دمای اتاق واکنش نشان می‌دهند. به عنوان مثال آنتی P<sub>1</sub>، آنتی M و آنتی Le<sup>b</sup> که در نتیجه‌ی آزمایش گروه‌بندی خونی تأثیر می‌گذارند و موجب عدم تطابق گروه‌بندی سرمی و سلولی می‌شوند. این مشکل را می‌توان با غربالگری آنتی‌بادی حل نمود (۲). در یک بررسی که در تهران انجام گرفته بود، حضور آلوآنتی‌بادی‌ها با شیوع ۲۳/۲ درصد، به عنوان شایع‌ترین علت مغایرت گروه‌بندی تلقی شد (۲۴).

### ۱۳. پلاسمافریزیس

در برخی موارد، تزریق ایمونوگلوبولین داخل رگی که از پلاسما‌ی افراد داوطلب گرفته می‌شود، می‌تواند در تعیین گروه خونی اختلال ایجاد کند. به این نحو که این پلاسما می‌تواند حاوی آنتی ABO باشد. برای تشخیص و تصحیح این گونه خطاها باید به سابقه‌ی بالینی بیمار توجه گردد و سوابق تزریقات قبلی بیمار بررسی شود (۲).

### ۱۴. آزمون کمبس مستقیم

در برخی موارد، گلبول‌های قرمز به حلی به

آنتی‌بادی حساس می‌شوند که به سرعت پس از افزودن آنتی A یا آنتی B لخته مشاهده می‌گردد. در نتیجه، آزمایش به شیوه‌ی مستقیم همیشه گروه خونی O را نشان می‌دهد. برای حل این مشکل، می‌بایست ابتدا آنتی‌بادی‌ها را از سطح گلبول‌های قرمز توسط حرارت یا با استفاده از مواد شیمیایی حذف نمود (۲). در یک بررسی که در تهران صورت گرفته بود، شیوع این علت مغایرت ۳۶ درصد گزارش شد (۲۴). یکی دیگر از روش‌های حل این مشکل، استفاده از تکنیک جذب یا آلوژن می‌باشد (۱۸، ۲).

### ۱۵. هیپوگاماگلوبولینمی

یکی دیگر از علل عدم تطابق گروه‌بندی ABO، می‌تواند فقدان ایزوآگلوتینین‌ها علیه آنتی‌ژن A و یا آنتی‌ژن B باشد که در آگاماگلوبولینما و یا هیپوگاماگلوبولینمای مراحل اولیه و ثانویه‌ی بیماری‌های نقص ایمنی و حتی بدخیمی‌ها دیده می‌شود (۳۷-۳۸، ۱۲). در بدخیمی‌هایی مثل مولتیپل میلوما، عدم تطابق ABO به خاطر حضور پروتئین‌های غیر طبیعی (ایجاد رولکسان) و یا فقدان ایزوآگلوتینین‌ها می‌باشد (۳۵). Kim و همکاران یک مورد با بیماری مولتیپل میلوما گزارش کردند که عدم تطابق گروه‌بندی ABO وی به خاطر فقدان ایزوآگلوتینین‌ها بود (۳۹). گفته شده است که این مورد حدود ۵ درصد از موارد مغایرت‌های گروه‌بندی ABO را در شهر تهران در سال‌های ۸۲-۱۳۸۱ به خود اختصاص داده است (۲۴).

### ۱۶. علل ژنوتیپی عدم تطابق گروه‌بندی ABO

یکی از دلایل عدم انطباق گروه‌بندی ABO در آن دسته از افرادی که فاقد آنتی‌بادی‌های قابل انتظار هستند، علل ژنوتیپی می‌باشد. طبق بررسی‌هایی که

Michino و همکاران گزارش کرده بودند، فرد دارای فنوتیپ O بود و آنتی‌ژن‌های A و B بر سطح گلبول‌های قرمز وی یافت نمی‌شد. از طرف دیگر، واکنش سلول‌های B با سرم این فرد مثبت اما واکنش سلول A با سرم وی منفی بود. پس از بررسی‌هایی متوجه حضور به نسبت کمی از سلول‌هایی در ناخن این فرد شدند که آل A را (علاوه بر سلول‌هایی با فنوتیپ O) در سطح خود بیان می‌کردند. حضور همین مقدار از آنتی‌ژن کافی بود تا فقدان آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن A در سرم فرد حاصل شود. علت این که بیان این آل A در ناخن فرد به خاطر وجود موزایسم سوماتیک بوده است و یا کیمریسم عامل اصلی می‌باشد، به سادگی قابل تشخیص نیست و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (۴۵).

#### ۱۷. وجود آنتی A<sub>1</sub> در خون افرادی با گروه خونی A<sub>2</sub>

در تعیین گروه خونی به طور معمول از آنتی A استفاده می‌شود. این به این معنی است که در این شیوه در ابتدا زیر گروه‌های A مورد لحاظ قرار نمی‌گیرند. این امر باعث آن می‌شود که در گروه‌بندی مستقیم، آنتی‌ژن A<sub>2</sub> را در سطح گلبول‌های قرمز شناسایی کنیم و از طرف دیگر، در گروه‌بندی غیر مستقیم نیز آنتی A<sub>1</sub> را در سرم بیابیم که منجر به عدم تطبیق گروه‌بندی مستقیم و معکوس می‌شود. برای حل این مشکل، می‌توان از معرف‌های مخصوص زیر گروه‌ها برای تعیین گروه خونی استفاده نمود (۲).

#### ۱۸. فنوتیپ A (B) و B (A)

گاهی بیان یکی از آنتی‌ژن‌های A یا B در سطح گلبول‌های قرمز، ضعیف می‌باشد و معرف‌های پلی‌کلونال که به طور معمول در آزمایشگاه‌های تشخیصی به کار برده می‌شوند، قادر به شناسایی این

Deng و همکاران روی افرادی با مغایرت در گروه‌بندی سرمی و سلولی انجام دادند، با یک مورد مواجه شدند که پاسخ سلول‌های واجد آنتی‌ژن A با سرم این بیمار مثبت بود، اما پاسخ سلول‌های واجد آنتی‌ژن B با سرم بیمار صفر بود. این در حالی بود که فنوتیپ گروه خونی O را نشان می‌داد. این عدم تطابق از حضور یک آل B<sub>101</sub> روی ژنوم فرد ناشی می‌شد. پس از بررسی ژنوتیپ یک سری از آل‌های ABO پی بردند که یک سری از آل‌ها باعث بیان ضعیف آنتی‌ژن‌های ABO می‌شوند و همچنین میزان بسیار کم یا فقدان آنتی‌بادی‌های سرمی نیز در این افراد دیده می‌شود (۴۰). بیان ضعیف آنتی‌ژن می‌تواند در اثر نقص ایمنی، در نوزادان، افراد مسن و یا همان‌طور که گفته شد، به خاطر زمینه‌ی ژنتیکی باشد (۴۱).

برای حل این مشکل، استفاده از تکنیک‌هایی برای بررسی ژنوتیپی این افراد پیشنهاد می‌شود. اگر چه بیشتر آل‌های O فنوتیپ قابل انتظار O را نشان می‌دهند، اما در این بین، یک سری آل‌های نامعمول وجود دارد که آنتی‌های A را به صورت ضعیف بیان می‌کنند. حضور این آل‌ها می‌تواند موجب عدم تطابق ژنوتیپ و فنوتیپ شود و در آزمایش‌های گروه‌بندی ABO اختلال ایجاد کند (۴۲). آل‌های غیر حذفی ABO\*O غالب‌ترین علت بسیاری از مشکلات مربوط به فقدان آنتی‌بادی در خون افرادی با فنوتیپ O می‌باشند (۴۳). بر اساس مطالعه‌ای در ژاپن که بر روی ۱۱۳۴ نفر انجام شد، علت عدم تطابق فنوتیپ و ژنوتیپ در افراد مشاهده شده یک نوع آل O با یک جهش نقطه‌ای در اگزون شماره‌ی ۶ و آل O دیگری با عدم حذف گوانین در نوکلئوتید ۲۶۱ گزارش شده بود (۴۴). در یک موردی که



دسته‌بندی نمود. شکل ۳ طبقه‌بندی عوامل ذاتی بر این اساس را نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن ارزیابی اولیه از آزمایش و یافتن واکنش عامل مورد مغایرت، می‌توان برای رفع آن اقدامات لازم را همان گونه که در این بخش ارائه گردید، اجرا نمود.

آنتی‌ژن‌های ضعیف بیان شده در سطح سلول نیستند. به همین دلیل، عدم تطابق در نتایج آزمایش‌های مستقیم و معکوس تعیین گروه خونی دیده می‌شود. برای حل این مشکل، می‌توان از معرف‌های منوکلونال استفاده کرد (۲).

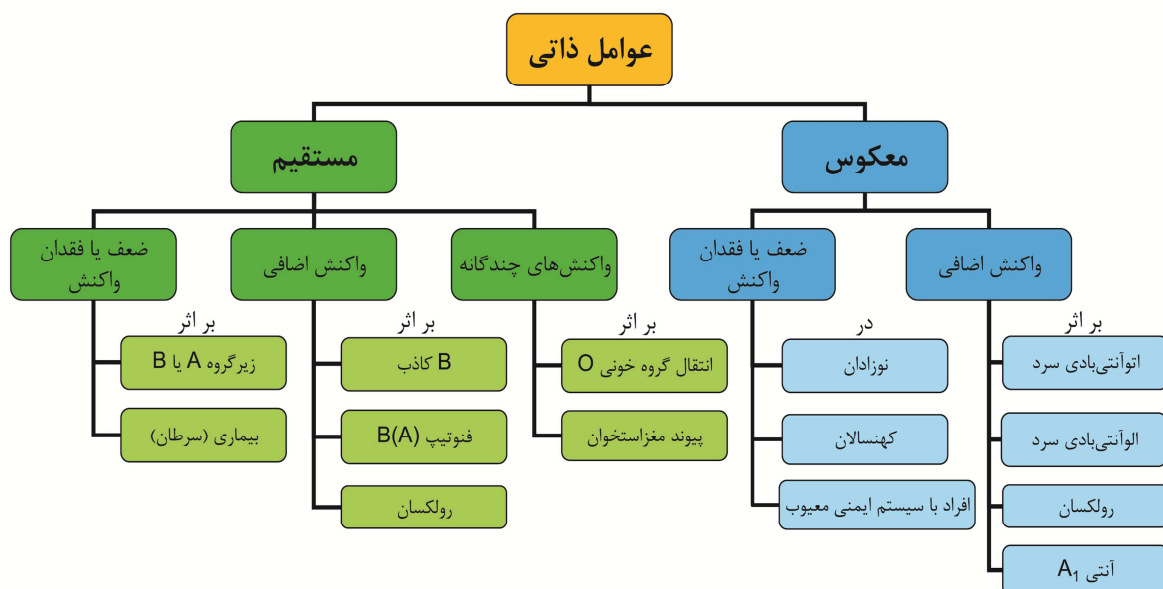
### ۱۹. فنوتیپ بمبئی

افراد با فنوتیپ بمبئی هیچ کدام از آنتی‌ژن‌های ABO را بر سطح گلبول‌های قرمز خود بیان نمی‌کنند. در آزمایش مستقیم و معکوس، نتایج مثل گروه‌خونی O می‌باشد. بر سطح سلول‌ها آنتی‌ژن وجود ندارد و در سرم نیز آنتی‌بادی وجود دارد. برای رفع این ابهام، از سلول‌هایی با فنوتیپ O به عنوان شاهد استفاده می‌شود (۲).

عوامل ذاتی مطرح شده را می‌توان در حالتی کلی بر اساس آن که «عدم مغایرت در واکنش مستقیم رخ دهد و یا در واکنش معکوس؟» و همچنین «آیا واکنش مورد شک ضعیف و یا اضافی است؟»، نیز

### بحث

همان گونه که اشاره شد، به لحاظ اهمیت سلامت انتقال خون، صحت آزمایش‌های گروه‌بندی ABO مورد تأکید می‌باشد. یکی از مهم‌ترین آزمایش‌هایی که قبل از انتقال خون صورت می‌گیرد، تعیین گروه خونی در سیستم ABO است. این آزمایش‌ها به صورت معمول یا از نوع آزمایش سلولی و یا از نوع آزمایش سرمی می‌باشند. بنا به علل مختلفی که در این مقاله‌ی مروری پوشش داده شد، گاهی بین نتیجه‌ی این دو آزمایش عدم انطباق دیده می‌شود.



شکل ۳. طبقه‌بندی عوامل ذاتی مؤثر بر ایجاد مغایرت گروه‌بندی مستقیم و معکوس سیستم ABO از منظر قدرت واکنش‌های رخ داده



دارد. این عوامل می‌تواند به دلیل سیستم متفاوت پذیرش بیمار و یا اهدا کننده و یا تفاوت‌های ژنتیکی عامل این اختلاف باشد. شناخت عوامل مؤثر بر این تفاوت‌ها، گامی مهم در راستای ارتقای کیفی سامانه‌ها و فرایندهای اهدا و انتقال خون است و نیازمند بررسی‌های بومی گسترده، مداوم و جدی در ایران می‌باشد.

در انتها، لازم به ذکر است که به عنوان عاملی مکمل پیشنهاد شود تا همواره سوابق بالینی پزشکی بیمار نیز در صورت در دسترس بودن، برای تفسیر نتایج لحاظ شوند. همچنین به کارگیری تکنیک‌های استاندارد در تعیین گروه‌خونی ABO برای کاهش خطاهای تکنیکی و ذاتی بسیار مؤثر است و از واکنش‌های حاد همولیتیک ناشی از تزریق خون ناسازگار جلوگیری خواهد کرد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های مرکز تحقیقات ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

این عوامل را می‌توان از منظری به دو دسته‌ی خطاهای تکنیکی، شخصی-دفتری و عوامل ذاتی دسته‌بندی نمود. بر اساس این دیدگاه، آموزش صحیح پرسنل مراکز بانک خون و بیمارستان‌ها می‌تواند در کاهش خطاهای تکنیکی و شخصی مؤثر باشد و از طرف دیگر آگاهی نسبت به عوامل ذاتی در تفسیر علل مغایرت بسیار مهم است.

در یک بررسی انجام شده در اصفهان، از ۴۱ مورد عدم انطباق به دست آمده از میان بیش از ۷۵ هزار واحد اهدایی خون، که اغلب مردان سنین ۴۰-۳۱ سال و دارای گروه خونی O بودند، ۴۱/۴۶ درصد مربوط به کاهش تیترا آنتی‌بادی و ۳۶/۱۶ درصد مربوط به کاهش غلظت آنتی‌ژن‌های سطحی و ۱۲/۱۹ درصد مربوط به آگلوتینین‌های سرد و ۱۲/۱۹ درصد مربوط به خطای آزمایشگر گزارش گردید (۲۵). حال آن‌که شایع‌ترین علت مغایرت در مطالعه‌ی انجام شده در تهران، آلوآنتی‌بادی‌ها با فراوانی ۲۳/۳ درصد گزارش شد (۲۴). نتایج این بررسی‌های آماری و مقایسه‌ی آن‌ها با سایر مطالعات جهانی در این زمینه، نشان از تفاوت‌هایی بنیادی در فراوانی عوامل مؤثر بر مغایرت گروه‌بندی مستقیم و معکوس سیستم ABO

### References

1. Landsteiner K. The specificity of serological reactions. New York, NY: Dover Publications; 1990.
2. Rudmann SV. Textbook of blood banking and transfusion medicine. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005.
3. Spalter SH, Kaveri SV, Bonnin E, Mani JC, Cartron JP, Kazatchkine MD. Normal human serum contains natural antibodies reactive with autologous ABO blood group antigens. *Blood* 1999; 93(12): 4418-24.
4. Filitti-Wurmser S. Natural antibodies and immune antibodies of human ABO blood group system. *Biochimie* 1976; 58(11-12): 1345-53.
5. Blaney KD, Howard PR. Basic and applied concepts of immunohematology. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, PA: Mosby; 2008.
6. Moayedi-Esfahani B. Clinical blood transfusion and lab methods. Isfahan, Iran: Neshat Publications; 1989. [In Persian].
7. Chiaroni J, Legrand D, Dettori I, Ferrera V. Analysis of ABO discrepancies occurring in 35 French hospitals. *Transfusion* 2004; 44(6): 860-4.
8. Mohammadi S, Dargahi H, Alizadeh S, Farshdusti-Hagh M, Dejhakhsh E. Agglutination tests quality control in

- hematology labs. Physician and Laboratory Journal 2010; 9(44): 7-10. [In Persian].
9. Linden JV, Wagner K, Voytovich AE, Sheehan J. Transfusion errors in New York State: an analysis of 10 years' experience. Transfusion 2000; 40(10): 1207-13.
  10. Kaplan HS, Battles JB, Van der Schaaf TW, Shea CE, Mercer SQ. Identification and classification of the causes of events in transfusion medicine. Transfusion 1998; 38(11-12): 1071-81.
  11. Alizadeh S, Farshdusti-Hagh M. Blood collection, handling and storage. Physician and Laboratory Journal 2008; 7(36): 17-21. [In Persian].
  12. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Philadelphia, PA: Saunders; 2001.
  13. Walker RH. AABB technical manual. 10th ed. Arlington, VA: American Association of Blood Banks; 1990.
  14. Farshdusti-Hagh M, Noruzinia M, Saki N. The importance of quality control in the preanalytical phase. Proceedings of the 2nd International and 7th National Congress on Quality Improvement in Clinical Laboratories; 2009 Apr 21-24; Tehran, Iran.
  15. Meade D, Stewart J, Moore BP. Automation in the blood transfusion laboratory. II. ABO grouping, Rh and Kell typing, antibody screening, and VD testing of blood donations in the autoanalyzer. Can Med Assoc J 1969; 101(9): 35-9.
  16. Chiaroni J, Lauroua P, Roubinet F, Mannessier L. Problem-solving in immunohematology: interpretation of ABO typing and its difficulties. Transfus Clin Biol 2000; 7(1): 84-95.
  17. Flynn JC. Essentials of immunohematology. Philadelphia, PA: Saunders; 1998.
  18. Golafshan H, Ghahremani MH, Sharifzadeh S. Lab principals in blood bank. Shiraz, Iran: Shiraz University of Medical Sciences; 1999. [In Persian].
  19. Myhre BA. Fatalities from blood transfusion. JAMA 1980; 244(12): 1333-5.
  20. Harmening D, Calhoun L, Polesky HF. Modern blood banking and transfusion practices. 5th ed. Philadelphia, PA: FA Davis; 2005.
  21. Klein HG, Anstee DJ. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. 11th ed. Hobken, NJ: Wiley; 2008.
  22. Sazama K. Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. Transfusion 1990; 30(7): 583-90.
  23. Rouger P, Le Pennec PY, Noizat-Pirenne F. Immunologic risk analysis of blood transfusion: 1991-1998. Transfus Clin Biol 2000; 7(1): 9-14.
  24. Selseleh M, Esmaeeli J. Evaluation of ABO group discrepancies in Tehran blood transfusion center, 2002 to 2003. Blood Transfusion Bulletin of North Central Region 2010; 53: 1-6. [In Persian].
  25. Rahgozar S, Yavari FM, Hariri MM, Moafi AR. ABO discrepancy prevalence and qualitative study of relevant factors in blood donors of Isfahan Regional Blood Transfusion Center. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2006; 3(1): 53-62. [In Persian].
  26. Judd WJ. Microbial-associated forms of polyagglutination (T, Tk and acquired-B). In: Beck ML, Judd WJ, editors. Polyagglutination, a technical workshop. Washington, DC: American Association of Blood Banks; 1980.
  27. Judd WJ, Annesley TM. The acquired-B phenomenon. Transfus Med Rev 1996; 10(2): 111-7.
  28. Marsh WL. The pseudo B antigen. A study of its development. Vox Sang 1960; 5: 387-97.
  29. Stratton F, Renton PH. Acquisition of B-like Antigen. Br Med J 1959; 2(5146): 244.
  30. Williamson P, Springer GF. Blood-group B active somatic antigen of E. coli O86:B7. Fed Proc 1959; 18: 604.
  31. Gerbal A, Maslet C, Salmon C. Immunological Aspects of the Acquired B Antigen. Vox Sanguinis 1975; 28(5): 398-403.
  32. Cameron C, Graham F, Dunsford I, Sickles G, Macpherson CR, Cahan A, et al. Acquisition of a B-like antigen by red blood cells. Br Med J 1959; 2(5140): 29-32.
  33. Giles CM, Mourant AE, Parkin DM, Horley JF, Tapson KJ. A weak B antigen, probably acquired. Br Med J 1959; 2(5140): 32-4.
  34. Farshdusti-Hagh M, Noruzinia M. Diagnostic values of diseases by using peripheral blood. Proceedings of the 2nd International and 7th National Congress on Quality Improvement in Clinical Laboratories; 2009 Apr 21-24; Tehran, Iran.
  35. Wilson JA, Jacobs A. ABO discrepancy in a multiple myeloma patient: a case study. Clin Lab Sci 2002; 15(4): 204-7.
  36. Landsteiner K. The nature and specificity of antibodies: the specificity of serological reactions. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1945. p. 127.
  37. Park TS, Oh SH, Choi JC, Kim HH, Park JH, Lee EY, Son HC. A Case of agammaglobulinemia detected by ABO discrepancy in a 13-year-old girl. Korean J Lab Med 2002; 22(5): 364-6.
  38. Oh SH, Kang CI, Kim J, Park TS. ABO discrepancy in a young Korean serviceman with common variable immunodeficiency. Ann Hematol 2010; 89(6): 629-30.

39. Kim SY, Oh SH, Park KS, Kim MJ, Lim G, Cho SY, et al. ABO discrepancy in an elderly patient with IgA kappa-type multiple myeloma. *Ann Hematol* 2010; 89(7): 747-8.
40. Deng ZH, Zeng JQ, Yu Q, Su YQ, Liang YL, Lu L, et al. Genotyping of samples lacking expected antibodies in ABO blood group. *J Clin Lab Anal* 2007; 21(6): 363-6.
41. Daniels G. *Human blood groups*, 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Scientific; 2002. p. 52.
42. Yazer MH, Hosseini-Maaf B, Olsson ML. Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(6): 618-24.
43. Wagner FF, Blasczyk R, Seltsam A. Nondeletional ABO\*O alleles frequently cause blood donor typing problems. *Transfusion* 2005; 45(8): 1331-4.
44. Mizuno N, Ohmori T, Sekiguchi K, Kato T, Fujii T, Fujii K, et al. Alleles responsible for ABO phenotype-genotype discrepancy and alleles in individuals with a weak expression of A or B antigens. *J Forensic Sci* 2004; 49(1): 21-8.
45. Michino J, Hata Y, Matsui K, Takizawa H, Kominato Y, Tabata S, et al. Demonstration of A antigen and A allele of ABO histo-blood group in nail in a case with the absence of A antigen and anti-A antibody in blood. *Leg Med (Tokyo)* 2005; 7(3): 194-7.

## A Review on Discrepancy of ABO Blood Grouping, Distribution of Causes in Iran and the World, and Resolving Methods

Narges Seyfizadeh MSc<sup>1</sup>, Nayer Seyfizadeh MSc<sup>2</sup>, Majid Farshdusti-Hagh PhD<sup>3</sup>

### Review Article

#### Abstract

**Background:** ABO blood grouping is the most important test that should be examined before blood transfusion. Transfusion of ABO incompatible blood leads to acute hemolytic reactions, malignant disease and in severe and uncontrolled cases might cause death.

**Methods:** Direct or forward blood grouping or cell typing (i.e. investigation of antigens on erythrocytes surface) and indirect grouping or reverse typing (i.e. investigation of serum antibodies) are the most common tests to determine blood groups in laboratory. Interpretation and compatibility of the results from blood grouping tests (cell typing and reverse typing) is a crucial step to decide and perform blood transfusion. In case of incompatible results of direct and indirect blood grouping, additional tests must be performed before reporting the results and in emergency blood transfusion situations, O+ RBCs should be used. In this manuscript, we reviewed and summarized factors involved in ABO blood group discrepancies. We studied reports in this context in Iran and the world and compared the most frequent incompatibility factors in Iran in comparison to the rest of the world. Finally, we suggested plausible methods which could be taken into account to lower the risk of incompatible blood transfusion in Iran.

**Conclusion:** Technical and clerical errors in Iran and the world, respectively, are reported to be the most common cause of ABO discrepancy. This result indicates different nature of ABO discrepancy factors between Iran and other countries. Understanding these differences is the very first step to improve blood donation and transfusion procedures locally and that requires long-term extensive domestic investigations.

**Keywords:** ABO blood grouping, Incompatible blood transfusion, Cell typing, Reverse typing

**Citation:** Seyfizadeh N, Seyfizadeh N, Farshdusti-Hagh M. A Review on Discrepancy of ABO Blood Grouping, Distribution of Causes in Iran and the World, and Resolving Methods. J Isfahan Med Sch 2014; 32(306): 1782-96

1-Department of Immunology, School of Medicine AND Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2- PhD Student, Department of Clinical Biochemistry and Laboratories, School of Medicine AND Umbilical Cord Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Laboratory Hematology and Blood Banking, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**Corresponding Author:** Nayer Seyfizadeh MSc, Email: seyfizadehn@tbzmed.ac.ir

## بررسی توزیع فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی مرکز آموزشی - درمانی الزهرا (س) در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی در بیمارستان

دکتر کامیار مصطفوی‌زاده<sup>۱</sup>، دکتر بهروز عطایی<sup>۲</sup>، رویا آزاد<sup>۳</sup>، امید پیرحاجی<sup>۳</sup>،  
علی مهربانی کوشکی<sup>۴</sup>، حمیدرضا صادقیان<sup>۳</sup>

### مقاله کوتاه

#### چکیده

**مقدمه:** یکی از مهم‌ترین مشکلات بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه، ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی است که منجر به مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک در این بخش‌ها می‌گردد. جهت رفع این مشکل تا کنون راهکارهای متعددی ارائه شده است که استقرار متخصصین عفونی در این بخش‌ها یکی از آنها است. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی و مقایسه‌ی میزان مصرف آنتی‌بیوتیک در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهرا (س) در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی در این بخش بود.

**روش‌ها:** این مطالعه یک مطالعه‌ی توصیفی - تحلیلی بود که در سال ۱۳۹۳ به انجام رسید. در این مطالعه، میزان مصرف آنتی‌بیوتیک در طول سال ۱۳۸۸ (قبل از استقرار متخصصین عفونی در بخش‌های مراقبت‌های ویژه) و در طول سال ۱۳۹۱ (بعد از اجرای طرح استقرار این متخصصین) تعیین و نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** از ۳۹ قلم آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، پس از اجرای طرح استقرار متخصصین عفونی در بخش مراقبت‌های ویژه، میزان مصرف ۲۳ آنتی‌بیوتیک (۵۳/۸ درصد) افزایش یافت و میزان مصرف ۱۶ آنتی‌بیوتیک (۴۶/۲ درصد) کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری بین میزان مصرف آنتی‌بیوتیک در قبل و بعد از اجرای طرح، مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** استقرار متخصصین عفونی در بیمارستان و ویزیت و مراقبت بیماران این بخش، منجر به محدود شدن مصرف برخی آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده‌ی درست و به‌جا از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در بیمارستان شد. از این رو، استمرار و توسعه می‌تواند در جهت کاهش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان مؤثر باشد.

**واژگان کلیدی:** آنتی‌بیوتیک، بخش مراقبت ویژه، متخصص عفونی

**ارجاع:** مصطفوی‌زاده کامیار، عطایی بهروز، آزاد رویا، پیرحاجی امید، مهربانی کوشکی علی، صادقیان حمیدرضا. بررسی توزیع فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی مرکز آموزشی - درمانی الزهرا (س) در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی در بیمارستان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۶): ۱۸۰۴-۱۷۹۷

۱- دانشیار، گروه عفونی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه عفونی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۴- اپیدمیولوژیست، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## مقدمه

عفونت یکی از مشکلات هر روزه در بخش‌های مراقبت ویژه است و به همین علت، آنتی‌بیوتیک‌ها از داروهای پرمصرف در این بخش‌ها می‌باشند. گذشته از درمان عفونت‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان پروفیلاکسی با هدف جلوگیری یا محدود کردن بیماری‌های عفونی در بیماران به شدت بدحال نیز استفاده می‌شوند (۱). برای استفاده‌ی درست از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش‌های مراقبت ویژه، باید به مسایلی از قبیل Out come بالینی بیمار، کنترل ظهور میکرو ارگانیسم‌های مقاوم و همچنین میزان هزینه‌بری توجه شود (۱).

بر طبق یک مطالعه، میزان آنتی‌بیوتیک مصرفی در بخش مراقبت‌های ویژه، ۱۰ برابر بخش‌های عمومی بوده است (۲). مطالعات بالینی متعددی نشان داده‌اند که ۵۰ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در ICU (Intensive care unit) نامناسب هستند (۳). چندین مطالعه نیز نشان داده است که سابقه‌ی تماس قبلی با آنتی‌بیوتیک‌ها با افزایش کلونیزاسیون باکتری‌ها و عفونت با ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ارتباط دارد (۴).

استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در ICU، یکی از دلایل اصلی به وجود آمدن عفونت‌های بیمارستانی در اثر باکتری‌های گرم منفی است (۵). ظهور میکرو ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بیماران بدحال، چالشی برای پزشکان بخش مراقبت‌های ویژه محسوب می‌شود (۶). یکی از مؤثرترین راه‌ها در جهت کاهش باکتری‌های مقاوم، تجویز منطقی و صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها است. به همین علت، استراتژی‌های متعددی از جمله ASP

(Antibiotic stewardship program) برای

جلوگیری از این مشکل تدوین شده‌اند (۷).

نظارت بر تجویز آنتی‌بیوتیک بر اساس انتخاب نوع دارو، دز تجویز شده و طول مدت مصرف آن در جهت رسیدن به اهداف پیشگیری و درمانی انجام می‌شود. به طور ایده‌آل، وقتی این نتایج حاصل می‌شود که عوارض جانبی داروها که با آن مواجه می‌شویم، کمتر باشد و همچنین خطر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها هم کمتر باشد.

نظارت بر تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها به طور مستقیم در ICUها اجرا می‌شود؛ چرا که مشخص شده است که رژیم درمانی نامناسب در ICU، منجر به افزایش مرگ و میر می‌شود (۸).

یکی از نگرانی‌های بزرگ در مورد عفونت‌ها، بروز آن‌ها در افراد بسیار بدحال بستری در ICUها است؛ چرا که در این بیماران، میزان مرگ و میر بالاتر است. کنترل دقیق و نظارت بر تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها در ICU، از اهمیت بسیاری برخوردار است. به همین علت، برنامه‌های نظارت بر تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها هم اکنون در بخش‌های مراقبت ویژه در حال اجرا می‌باشد، تا مصرف نابه‌جای آنتی‌بیوتیک در بیماران بستری کاهش یابد (۹). بر اساس موارد پیش‌گفته، نظارت دقیق بر تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر این که از عوارض و تداخلات دارویی ناخواسته می‌کاهد، موجب کاهش هزینه‌ی سنگین درمانی برای بیمار و همچنین جلوگیری از ظهور ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود و از به وجود آمدن یک بحران جهانی جلوگیری می‌کند.

در این راستا از چندین سال قبل، طرح استقرار متخصصین عفونی در برخی بیمارستان‌ها و مراکز

آموزشی - درمانی به اجرا در آمد، اما تا کنون مطالعه‌ای به منظور ارزشیابی تأثیر استقرار متخصصین عفونی در کاهش مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها انجام نگرفته است. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر حضور و نظارت متخصصین عفونی در کاهش مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهرا (س) در سال ۱۳۹۳ به انجام رسید.

### روش‌ها

این مطالعه، یک مطالعه‌ی توصیفی - تحلیلی از نوع قبل و بعد بود که در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۹۱ در مرکز آموزشی - درمانی الزهرا (س) اصفهان به انجام رسید. جامعه‌ی آماری مورد مطالعه شامل آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در این دو مقطع زمانی در بیمارستان محل مطالعه بود.

معیارهای ورود به مطالعه شامل آنتی‌بیوتیک مصرفی در یک یا دو مقطع زمانی مورد اشاره و وجود آمار مصرف آنتی‌بیوتیک در واحد امور دارویی مرکز آموزشی - درمانی الزهرا (س) و امکان دسترسی به آمار آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی بود.

نمونه‌گیری در این مطالعه، به شیوه‌ی سرشماری بود و طی آن، کلیه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در طول سال ۱۳۸۸ (قبل از اجراء طرح استقرار متخصصین عفونی در بیمارستان) و سال ۱۳۹۱ (۳ سال بعد از استقرار متخصصین عفونی) بود.

در طرح استقرار متخصصین عفونی، هر کدام از اعضای هیأت علمی گروه عفونی به مدت یک ماه فقط بیماران ICU را ویزیت می‌کنند و به صورت روزانه، در صورت لزوم در خصوص ادامه، تغییر یا

قطع آنتی‌بیوتیک‌ها تصمیم‌گیری می‌نمایند. روش اجرای طرح بدین صورت بود که با مراجعه‌ی پژوهشگر به واحد امور دارویی مرکز آموزشی - درمانی الزهرا (س)، با استفاده از بانک اطلاعات دارویی این واحد، کلیه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در بخش مراقبت‌های ویژه در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۹۱ استخراج و در چک لیست ویژه‌ای که به همین منظور تهیه شده بود، ثبت گردید.

داده‌های مطالعه بعد از جمع‌آوری وارد رایانه شد و به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت تحلیل داده‌ها از آزمون آماری  $t$  زوجی استفاده شد.

### یافته‌ها

در این مطالعه، ۳۹ مورد از آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در بخش مراقبت‌های ویژه در دو مقطع زمانی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۹۱ مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کل اقلام آنتی‌بیوتیک مصرفی در سال ۱۳۸۸ شامل ۳۱ قلم و در سال ۱۳۹۹ شامل ۳۴ قلم بود و ۸ قلم دارو (۲۳/۷ درصد) قبل از مداخله و ۵ قلم (۱۳/۲ درصد) بعد از مداخله مصرف نداشت. علل عدم مصرف این داروها در دو مقطع زمانی پیش‌گفته، در قسمت بحث مورد تجزیه و تحلیل مطرح می‌شود. در جدول ۱، توزیع فراوانی نوع داروهای مصرفی در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی آمده است. مجموع کل آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در سال ۱۳۸۸ (قبل از استقرار متخصصین عفونی) ۱۹۱۰۲۵۴۰ واحد و در سال ۱۳۹۱ (بعد از استقرار متخصصین عفونی) ۲۷۵۲۹۷۹۸ واحد بود (شکل ۱).



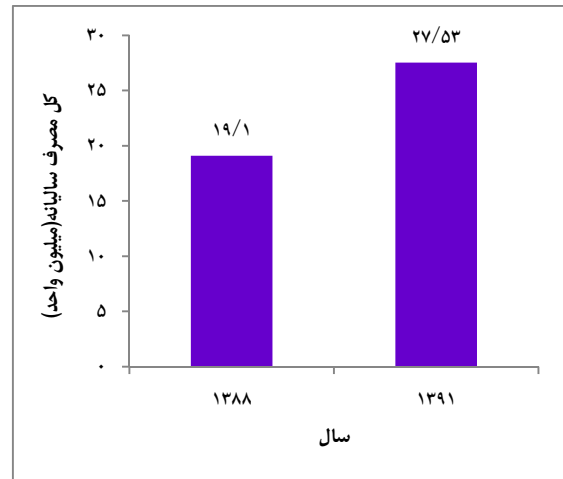
برابر نتایج بدست آمده، در بعد از اجرای طرح استقرار متخصصین عفونی، مصرف آنتی‌بیوتیک در ۲۱ مورد (۵۳/۸ درصد) کاهش یافت و در ۱۸ مورد (۱۸/۰ درصد) افزایش یافت و بر حسب آزمون  $\chi^2$ ، مصرف انواع آنتی‌بیوتیک در دو مقطع زمانی اختلاف معنی‌دار داشت ( $P < ۰/۰۰۱$ ).

در جدول ۱، مقدار آنتی‌بیوتیک مصرفی به تفکیک نوع آنتی‌بیوتیک در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی آمده است. بر اساس این جدول، پر مصرف‌ترین دارو در قبل از استقرار متخصصین عفونی مروپنم با فراوانی مصرف ۳۲۸۹۵۰۰ واحد و در بعد از استقرار، سفتازیدیم با فراوانی ۶۴۲۷۰۰۰ عدد بود.

### بحث

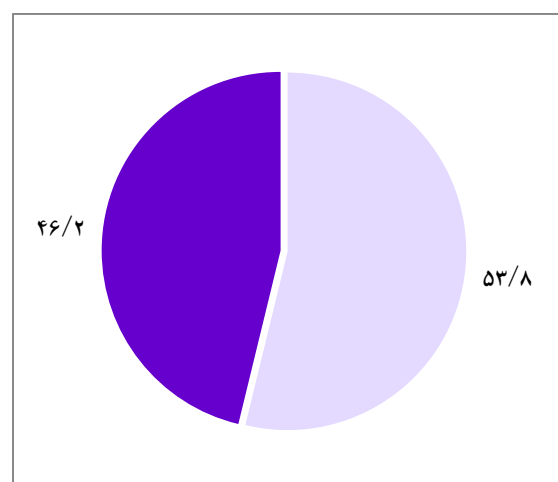
هدف کلی از انجام این مطالعه، مقایسه‌ی توزیع فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهرا (س) در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی بود. بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، از مجموع ۳۹ قلم آنتی‌بیوتیک در سال ۱۳۸۸، مصرف ۸ قلم دارو شامل تارگوسید، ریفامپین، سفپیم، کلاریترومایسن، افلوکساسیلین، آموکسی سیلیسن، اتامبوتول و کوآموکسی کلاو صفر بوده است. همچنین میزان مصرف ۵ قلم دارو شامل آمفوتریسین B، فلوکونازول، آسیکلوویر و مترونیدازول در سال ۱۳۹۱، صفر بود.

عدم مصرف آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده در قبل و بعد از اجرای طرح حضور متخصصین عفونی، می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله کمبود آنتی‌بیوتیک‌ها در بازار دارویی، عدم اندیکاسیون



شکل ۱. کل مصرف سالانه‌ی آنتی‌بیوتیک در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی

میانگین مصرف سالانه‌ی هر آنتی‌بیوتیک در قبل از اجرای طرح استقرار پزشک متخصصین عفونی،  $۹۴۱۲۷۴ \pm ۴۸۹۸۰۹$  واحد و در بعد از استقرار متخصصین عفونی،  $۱۶۷۸۱۸۰ \pm ۷۰۵۸۹۲$  واحد بود. طبق آزمون t زوجی، اختلاف معنی‌داری در میانگین مصرف سالانه‌ی هر آنتی‌بیوتیک در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی وجود نداشت ( $P = ۰/۲۹۰$ ) (شکل ۲).



شکل ۲. درصد فراوانی تغییرات مصرف انواع آنتی‌بیوتیک در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی

جدول ۱. توزیع مصرف آنتی‌بیوتیک در بخش مراقبت ویژه در قبل و بعد از استقرار متخصصین عفونی

آنتی‌بیوتیک	قبل استقرار	بعد استقرار	آنتی‌بیوتیک	قبل استقرار	بعد استقرار
آمفوتریسین B	۲۷۰۰	۰	ایمی‌پنم	۹۵۷۲۵۰	۲۰۹۵۰۰
آمپی‌سیلین	۴۰۸۰۰	۱۷۴۲۵۰	ایزونیازید	۳۵۰۰	۴۷۰۰
سفازولین	۲۷۳۷۴۰۰	۱۴۴۷۵۰۰	مروپنم	۳۲۸۹۵۰۰	۶۰۰۴۵۰۰
آزیترومایسین	۳۴۰۰۰	۱۴۱۰۰	مترونیدازول	۳۳۴۳۵۰	۰
آمیکاسین	۳۰۴۸۰	۱۸۲۰۰۰	نیتروفورانتوئین	۱۲۰۰	۵۳۶۷۰۰
سفیکسیم	۴۸۰۰	۲۳۴۰۰	پنی‌سیلین G (واحد)	۷۸۰۰۰۰۰	۱۱۸۰۰۰۰۰
سفتوآکسیم	۱۱۰۵۰۰	۳۷۰۰۰	تازوسین	۲۶۰۷۷۵۰	۹۱۴۶۲۵
سفتازیدیم	۵۲۹۵۰۰	۶۴۲۷۰۰۰	وانکومایسین	۳۰۱۴۰۰۰	۶۳۸۸۰۰۰
سفتی‌زوکسیم	۲۰۲۶۵۰۰	۵۹۵۸۰۰	آمپی‌سولبیا‌تام	۷۳۵۰۰	۱۴۵۵۰۰
سفتریاکسون	۱۵۲۶۵۰۰	۱۶۳۵۵۰۰	تتراسیکلین	۸۵۰۰	۲۵۰۰
سفالکسین	۳۴۵۰۰	۲۱۵۰۰	آسیکلوویر	۴۹۵۰۰	۹۷۲۰۰
سیپروفلوکساسین	۵۸۰۶۰۰	۷۳۱۶۵۰	تارگوسید	۰	۹۷۲۰۰
کلیندامایسین	۸۳۲۸۰۰	۶۴۳۲۰۰	ریفامپین	۰	۲۵۹۵۰
کلوگزاسیلین	۳۸۷۵۰	۳۶۲۵۰	سفی‌پیم	۰	۷۴۹۰۰۰
کوآتریموکسازول	۱۳۳۴۴۰	۵۱۸۴۰	کلاریترومایسین	۰	۵۵۰۰
داکسی‌سیکلین	۶۰۰	۱۳۰۰	افلوکساسین	۰	۹۲۰۰
اریترومایسین	۷۹۶۰	۳۴۷۲۰۰	آموکسی‌سیلین	۰	۲۳۷۵۰
فلوکونازول	۶۹۱۰۰	۰	اتامبوتول	۰	۴۰۰
آسیکلوویر	۹۵۰۰	۰	کوآموکسی‌کلاو	۰	۲۵۶۲۵
جتنامایسین	۲۰۷۸۰	۱۴۸۴۰			

مصرف آن‌ها در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه، تغییر پروتکل‌های پروفیلاکسی و درمان و از همه مهم‌تر، تجویز آنتی‌بیوتیک به صورت تخصصی و بر حسب آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام باشد. به عنوان مثال، مصرف تارگوسید، ریفامپین، سفپیم، کلاریترومایسین، افلوکساسیلین، آموکسی‌سیلین، اتامبوتول و کوآموکسی‌کلاو در بعد از استقرار متخصصین عفونی، به علت تخصصی بودن این آنتی‌بیوتیک‌ها و تجویز آن‌ها به وسیله متخصصین عفونی مستقر در بیمارستان‌ها بوده است.

نکته‌ی حایز اهمیت دیگر در خصوص استقرار متخصصین عفونی، جلوگیری از مصرف بی‌رویه‌ی

آنتی‌بیوتیک به عنوان پروفیلاکسی در بیماران بستری در ICU می‌باشد؛ به طوری که بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، مجموع کل آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در سال ۱۳۹۱ که توسط متخصصین عفونی تجویز گردید، نسبت به سال ۱۳۸۸ که تجویز آنتی‌بیوتیک توسط متخصصین دیگر رشته‌ها انجام گرفت، به میزان ۶۵۳۵۷۲۰۸۰ واحد (معادل ۱۸/۲ درصد) کاهش داشت که این دستاورد، علاوه بر جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، با کاهش چشمگیر هزینه‌های بیمارستانی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه همراه بود.

از طرف دیگر، تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های

کلونیزاسیون باکتری‌ها و عفونت با ارگانسیم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ارتباط دارد (۴).

همچنین استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در ICUها یکی از دلایل اصلی به وجود آمدن عفونت‌های بیمارستانی در اثر باکتری‌های گرم منفی است (۱۲-۱۱، ۵) و ظهور میکرو ارگانسیم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بیماران بدحال چالشی برای پزشکان ICUها محسوب می‌شود (۱۴-۱۳).

بنابر یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، مصرف تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها در بعد از استقرار متخصصین کاهش یافت و در مقابل، مصرف تعدادی دیگر افزایش یافت که در خصوص این تغییرات، علاوه بر نقش استقرار متخصصین، عوامل دیگری همچون تغییرات قیمت دارو، وجود دارو در بازار دارویی، ورود آنتی‌بیوتیک‌های جدید، تفاوت شیوع انواع بیماری‌ها با توجه به سال و فصل و اختلاف نظرهای موجود بین متخصصین در آن دخیل هستند.

از طرف دیگر، هدف از طرح استقرار متخصصین عفونی، کاهش سرانه‌ی مصرف آنتی‌بیوتیک در بخش مراقبت‌های ویژه نبود؛ بلکه هدف، مصرف به‌جا و منطقی دارو بود. از این رو، افزایش کمی مصرف دارو، دلیل بر بدتر شدن مدیریت مصرف دارو نیست. نتیجه‌گیری کلی این که استقرار متخصصین عفونی در بیمارستان و ویزیت و مراقبت بیماران این بخش، منجر به محدود شدن مصرف برخی آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده‌ی درست و به‌جا از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در بیمارستان می‌شود و استمرار و توسعه می‌تواند در جهت کاهش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارستان مؤثر باشد.

معمولی مانند آموکسی سیلین، آمپی سیلین، اریترومايسين، داکسی ساکلین و کواموکسی کلاو در سال ۱۳۸۸ هیچ مصرفی در بخش مراقبت‌های ویژه نداشتند؛ بدین مفهوم که متخصصین غیر عفونی اغلب از آنتی‌بیوتیک‌های قوی و وسیع‌الطیف استفاده نموده‌اند. در صورتی که برای تعدادی از بیماران، مصرف آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف ضروری نبوده و آنتی‌بیوتیک‌های معمولی و غیر وسیع‌الطیف در آنها مورد استفاده قرار گرفته است.

آنتی‌بیوتیک‌ها جزء پر مصرف‌ترین داروها هستند و به طور متوسط در کشورهای در حال توسعه، ۳۵ درصد از کل بودجه‌ی اختصاص یافته به بخش سلامت برای آنتی‌بیوتیک‌ها صرف می‌شود (۹). در حالی که بسیاری از موارد تجویز آنتی‌بیوتیک غیر ضروری است و علاوه بر افزایش هزینه‌های بستری و توسعه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، موجب ایجاد عوارض ناخواسته‌ی دارویی از جمله واکنش‌های افزایش حساسیتی، عوارض کلیوی، عوارض ریوی و عوارض دستگاه عصبی مرکزی می‌گردد (۱۰).

برای استفاده‌ی درست از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش مراقبت‌های ویژه، باید به مسایلی از قبیل پیابند بالینی بیمار، کنترل ظهور میکرو ارگانسیم‌های مقاوم و همچنین میزان هزینه‌بری توجه شود (۱). بر اساس مطالعه‌ی Bergmans و همکاران، میزان آنتی‌بیوتیک مصرفی در ICUها، ۱۰ برابر بخش‌های عمومی است (۲). مطالعات بالینی متعددی نیز نشان داده‌اند که ۵۰ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در ICUها نامناسب هستند (۳). چندین مطالعه نشان داده است که سابقه‌ی تماس قبلی با آنتی‌بیوتیک‌ها با افزایش

انجام این طرح پژوهشی مبدول داشتند سپاسگزاری می‌نماییم.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که نهایت همکاری خود را در

### References

1. Malacarne P, Rossi C, Bertolini G. Antibiotic usage in intensive care units: a pharmaco-epidemiological multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(1): 221-4.
2. Bergmans DC, Bonten MJ, Gaillard CA, van Tiel FH, van der Geest S, de Leeuw PW, et al. Indications for antibiotic use in ICU patients: a one-year prospective surveillance. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39(4): 527-35.
3. Lee KR, Leggiadro RJ, Burch KJ. Drug use evaluation of antibiotics in a pediatric teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15(11): 710-2.
4. De AG, Restuccia G, Cauda R, Tacconelli E. How could we reduce antibiotic use in critically ill patients? *Infect Disord Drug Targets* 2011; 11(4): 376-83.
5. Gruson D, Hilbert G, Vargas F, Valentino R, Bebear C, Allery A, et al. Rotation and restricted use of antibiotics in a medical intensive care unit. Impact on the incidence of ventilator-associated pneumonia caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(3 Pt 1): 837-43.
6. McGowan JE, Jr. Do intensive hospital antibiotic control programs prevent the spread of antibiotic resistance? *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15(7): 478-83.
7. Murray BE. Can antibiotic resistance be controlled? *N Engl J Med* 1994; 330(17): 1229-30.
8. Arnold HM, Micek ST, Skrupky LP, Kollef MH. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Semin Respir Crit Care Med* 2011; 32(2): 215-27.
9. Isturiz RE, Carbon C. Antibiotic use in developing countries. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21(6): 394-7.
10. Ziment I. Complications of antibiotic therapy. *Calif Med* 1972; 117(5): 24-48.
11. Carey B, Cryan B. Antibiotic misuse in the community--a contributor to resistance? *Ir Med J* 2003; 96(2): 43-4, 46.
12. WHO reports. Available from: URL: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/antibiotic-resistance>.
13. World Health organization. The top 10 causes of death. The 10 leading causes of death by broad income group [Online]. [cited 2008]; Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs310/en>
14. Conly J. Antimicrobial resistance in Canada. *CMAJ* 2002; 167(8): 885-91.

## The Effect of Infectious Disease Specialists Deployment Plan on Using Antibiotics in Alzahra Hospital, Isfahan, Iran

Kamyar Mostafavizadeh MD<sup>1</sup>, Behrouz Ataei MD<sup>2</sup>, Roya Azad<sup>3</sup>, Omid Pirhaji<sup>3</sup>,  
Ali Mehrabi Koushki MSc<sup>4</sup>, Hamidreza Sadeghian<sup>3</sup>

### Short Communication

#### Abstract

**Background:** One of the most prevalent problems among hospitalized patients in intensive care units (ICUs) is infectious diseases that lead to high usage of antibiotics. This study was designed to evaluate the antibiotic usage in intensive care units of Alzahra Hospital, Isfahan, Iran, before (in 2010) and after (in 2014) the presence of infectious disease specialists.

**Methods:** In a cross-sectional study, we measured the total rate of antibiotics usage in intensive care units of Alzahra Hospital in 2010 and 2014. SPSS<sub>22</sub> software was used for the statistical analysis.

**Findings:** Of the 39 evaluated antibiotics, use of 23 antibiotics (53.8%) were increased and of 16 (46.2%) were decreased after infectious disease specialists arrival. There was not a significant statistical difference between the mean of antibiotics consumption in 2010 and 2014 ( $P = 0.29$ ).

**Conclusion:** We suggest that additional studies should be performed to evaluate the causes of increasing usage of some antibiotics consumption and decreasing of others such as price, indication and contraindications, and access of antibiotics.

**Keywords:** Antibiotic, Intensive care unit, Infectious disease specialist

**Citation:** Mostafavizadeh K, Ataei B, Azad R, Pirhaji O, Mehrabi Koushki A, Sadeghian H. **The Effect of Infectious Disease Specialists Deployment Plan on Using Antibiotics in Alzahra Hospital, Isfahan, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(306): 1797-804

1- Associate Professor, Department of Infectious Diseases, School of Medicine AND Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Infectious Diseases, School of Medicine AND Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

4- Epidemiologist, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Roya Azad, Email: thebluedream2003@yahoo.com

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

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

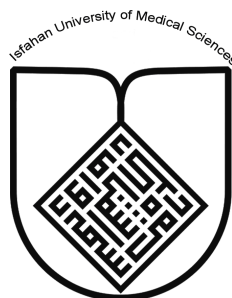
## INSTRUCTION TO AUTHORS

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



### *Editorial Board (In alphabetical order)*

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



## JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 32, No. 306, 3<sup>rd</sup> week, December 2014

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

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

---

### Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

E-mail: [publications@mui.ac.ir](mailto:publications@mui.ac.ir)

### Office:

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

Telefax: +98 311 7922291

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

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

Office Secretary: Golnaz Rajabi

### Copy edit, Layout edit, Design and Print:

Farzanegan Radandish Co.

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

Telefax: +98 311 6686302

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

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

[www.farzaneganco.ir](http://www.farzaneganco.ir)

Circulation: 500

---

### This journal is indexed in the following international 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](http://www.sid.ir))
- [www.iranmedex.com](http://www.iranmedex.com)

---

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

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