دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

شماره استاندارد بین المللی: ۱۰۲۷-۷۵۹۵
شماره استاندارد آن لاین: ۱۷۳۵-۸۵۴x

هفته‌نامه

سال سی و دوم/شماره ۲۷۲/ هفته اول فروردین ۱۳۹۳

Print ISSN: 1027-7595
Online ISSN: 1735-854x

Weekly Vol. 32, No. 272, 1st Week, April 2014

مقاله‌های پژوهشی

جداسازی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی ژنوتیپی سودوموناس آئروجینوزای مولد عفونت مجاری ادراری در بیماران بستری شده از بیمارستان‌های شهدا و لبافی‌نژادتهران.....۱
دکتر نسترن اصغری مقدم، رضا رسول‌زاده، دکتر سید محمد مهدی حسینی مقدم، دکتر مهناز سیفی، دکتر محمدرضا پورشفیع، دکتر ملیحه طالبی

بررسی اثر تستوسترون بر میانگین غلظت عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و عامل رشد فیبروبلاستی بازی (bFGF) در رت‌های ویستار نر.....۹
فرید نصر اصفهانی، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد، مریم مؤتمر، سعیده بحرانی، زهراالسادات مرتضوی

بررسی تأثیر درمان فاز اول بیماری پریودنتال بر فراوانی تولد نوزادان زودرس و با وزن کم در مادران باردار مبتلا به بیماری پریودنتال.....۱۶
دکتر محمد رضا ناصح، دکتر آذین وحید، دکتر نازنین زنگنه، دکتر فاطمه لالوها، دکتر مرضیه رضایی، دکتر نوید محمدی، فرحناز رضایی

بررسی ارتباط پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu با خونریزی سیستم اعصاب مرکزی در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳.....۲۵
دکتر مجید نادری، اکبر درگلاله، دکتر شعبان علیزاده، دکتر احمد کاظمی، شادی طبیبیان، دکتر حسین درگاهی، زهرا کاشانی خطیب، میثم کشیری، مریم سادات حسینی

مقاله مروری

موانع و محدودیت‌های کلینیکی انجام Small interfering RNA delivery(siRNA delivery) بر پایه‌ی وکتورهای غیر ویروسی.....۳۴
رضا قویمی، دکتر معراج پورحسین

Original Articles

Isolation, Antibiotic Resistance Determination and Genotypic Analysis of Pseudomonas Aeruginosa Strains Causing Urinary Tract Infection in Catheterized Patients of Shohada and Labafi Nejad Hospitals, Tehran, Iran.....8
Nastaran Asghari-MoghadamPhD, Reza Rasoolzadeh MSc, Seyyed Mohamad-Mahdi Hoseini-Moghadam MD, Mahnaz Seifi PhD, Mohamad Reza Pour-Shafie PhD, Maliheh Talebi PhD

Determination of the Testosterone Effect on the Average Concentration of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and Platelet-Drived Growth Factor (PDGF) in Male Wistar Rats.....15
Farid Nasr-Esfahani, Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD, Maryam Motamer, Zahra Sadat Mortazavi, Saeideh Bahrani

The Effects of Periodontal Treatment on Incidence of Preterm Low Birth Weight among Pregnant Women with Mild to Moderate Periodontitis.....24
Mohammad Reza Naseh MD, Azin Vahid DDS, Nazanin Zangeneh DDS, Fatemeh Lalooha MD, Marziyeh Rezaee MD, Navid Mohammadi PhD, Farahnaz Rezaee

Role of Pro564Leu of FXIII-A Gene Polymorphism and Risk of Central Nervous Bleeding in Patients with Congenital Factor XIII Deficiency, Southeast of Iran.....33
Majid Naderi MD, Akbar Dorgalaleh MSC, Shaban Alizadeh PhD, Ahmad Kazemi PhD, Shadi Tabibian MSC, Hossein Dargahi PhD, Zahra Kashani-Khatib MSc, Meysam Kahiri MSC, Maryamsadat Hoseini MSc

Review Article

Bottlenecks in Clinical Application of siRNA Delivery Based on Non-Viral Vectors.....49
Reza Ghavimi MSc, Meraj Pourhossein PhD

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۷۲)، هفته اول فروردین ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

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

امور نشر:
(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)
شرکت فرزانگان راداندیش
اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵
تلفن و دورنگار: ۶۶۸۶۳۰۲-۰۳۱۱

f.radandish@gmail.com
www.farzaneganco.ir
تیراژ: ۵۰۰ نسخه

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

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

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

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

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

نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی
۱- دکتر مجتبی ابطحی	دانشیار، متخصص گوش و حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دکتر ابراهیم اسفندیاری	استاد، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دکتر محمد اسماعیل اکبری	استاد، فوق تخصص جراحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دکتر فرامرز اسماعیل بیگی	استاد، متخصص داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، آمریکا
۵- دکتر افسون امامی	دانشیار، فوق تخصص نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- شاهین امامی	گروه بیوشیمی و غدد داخلی، بیمارستان سن آنتونیو، فرانسه
۷- دکتر علیرضا امامی	دانشیار، متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۸- دکتر بابک امرا	استاد، فوق تخصص ریه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۹- دکتر رضا امین	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۱۰- دکتر کن باست	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۱۱- دکتر رضا باقریان سرارودی	استادیار، متخصص روانشناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۲- دکتر مجید برکتین	دانشیار، متخصص روانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۳- فرزین پور فرزاد	گروه 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 ایمونولوی، 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 عادلی	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۲۶- دکتر سعید عندلیب	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لویس 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، امریکا
۳۲- دکتر منصور کارآموز	استاد، متخصص اورولوژی، کالیفرنیا، امریکا
۳۳- دکتر رویا کلیشادی	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۴- دکتر جعفر گلشاهی	دانشیار، فوق تخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۵- دکتر عزیز گهری	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	دانشیار، فوق تخصص آسیب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	دانشیار، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر هوشنگ معین	استاد، متخصص جراحی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۰- دکتر اتیه مغیثی	استاد، متخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، امریکا
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، ایران
۴۴- دکتر علی محمد هنجنی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی 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 دست نوشته‌ها 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 دست نوشته باید یک نامه تایپ شده (Covering letter) به سردبیر، شامل عنوان و اسامی نویسنده یا نویسندگان و اعلام این که این دست نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است و یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد، ارسال گردد.

۴- دست‌نوشته باید توسط نرم‌افزار MS Word در سایز A_4 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- دست نوشته باید شامل صفحه عنوان، چکیده، مقدمه ، روش‌ها، یافته‌ها، بحث، تقدیر و تشکر و منابع باشد.
صفحه عنوان: این صفحه بایدشامل 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 ۵-۳ 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): Inser N. Treatment of calcific aortic stenosis. Am J Cardiol 1987; 59(6): 314-7.

(FA): Zini F, Basiri Jahromo 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. 15th ed. New York: Oxford Univ Press; 1987.p.43-5.

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

اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

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

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

۱۵- **نمونه‌خوانی (Proofreading):** یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده مسؤول 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 عبارت های 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 مسؤول ارسال خواهد شد.

۱۹- **ملاحظات اخلاقی:** این ملاحظات باید در بخش روش‌ها اشاره گردند. اخذ رضایت‌نامه از کلیه‌ی افراد بالغ شرکت کننده در مطالعه ضروری است و در مورد کودکان و افراد تحت تکفل باید از ولی قانونی آنها اخذ شود. ذکر منبع تأیید کننده‌ی ملاحظات اخلاقی مطالعه لازم است. هنگام استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ذکر رعایت و مقررات استاندارد مربوط لازم است.

۲۰- **تداخل منافع (Conflict of Interest):** نویسنده یا نویسندگان باید هر گونه ارتباط مالی مانند دریافت هزینه، حق‌الزحمه، مواد و تجهیزات از دانشگاه‌ها، سازمان‌ها، نهادها، شرکت‌ها و سایر منابع که انتشار یافته‌های مطالعه می‌تواند به آنها سود یا زیان برساند را اعلام نمایند.

۲۱- **هزینه چاپ:** هیچ گونه هزینه‌ای برای چاپ مقالات در این مجله دریافت نمی‌شود.

۲۲- **حق نسخه‌برداری (Copyright):** تمامی محتویات مجله دانشکده پزشکی اصفهان تحت قانون حق نسخه‌برداری بین‌المللی قرار دارد. این مجله برای استفاده غیر تجاری در اختیار افراد قرار می‌گیرد. اصلاح، انتشار، انتقال و نمایش هر گونه محتویات مجله بدون ذکر نام این مجله ممنوع است.

۲۳- **فرآیند مرور دقیق (Peer Review):** تمام دست‌نوشته‌ها توسط حداقل ۳ نفر از داوران منتخب شورای نویسندگان مجله مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. نویسنده‌ی مسؤول در کوتاه‌ترین زمان در جریان تصمیم سردبیر 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 مسؤول 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

جداسازی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی ژنوتیپی سودوموناس آئروجینوزای مولد عفونت مجاری ادراری در بیماران بستری شده از بیمارستان‌های شهدا و لبافی‌نژادتهران..... ۱

دکتر نسترن اصغری مقدم، رضا رسول‌زاده، دکتر سید محمد مهدی حسینی مقدم، دکتر مهناز سیفی، دکتر محمدرضا پورشفیع، دکتر ملیحه طالبی

بررسی اثر تستوسترون بر میانگین غلظت عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و عامل رشد فیبروبلاستی بازی (bFGF) در رت‌های ویستار نر..... ۹

فرید نصر اصفهانی، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد، مریم مؤتمر، سعیده بحرانی، زهراالسادات مرتضوی

بررسی تأثیر درمان فاز اول بیماری پریودنتال بر فراوانی تولد نوزادان زودرس و با وزن کم در مادران باردار مبتلا به بیماری پریودنتال..... ۱۶

دکتر محمد رضا ناصح، دکتر آذین وحید، دکتر نازنین زنگنه، دکتر فاطمه لالوها، دکتر مرضیه رضایی، دکتر نوید محمدی، فرحناز رضایی

بررسی ارتباط پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu با خونریزی سیستم اعصاب مرکزی در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳..... ۲۵

دکتر مجید نادری، اکبر درگلاله، دکتر شعبان علیزاده، دکتر احمد کاظمی، شادی طبیبیان، دکتر حسین درگاهی، زهرا کاشانی خطیب، میثم کشیری، مریم سادات حسینی

مقاله مروری

موانع و محدودیت‌های کلینیکی انجام Small interfering RNA delivery (siRNA delivery) بر پایه‌ی وکتورهای غیر ویروسی..... ۳۴

رضا قویمی، دکتر معراج پورحسین

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/ شماره ۲۷۲/ هفته اول فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲

جداسازی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی ژنوتیپی سودوموناس آئروجینوزای مولد عفونت مجاری ادراری در بیماران بستری شده از بیمارستان‌های شهدا و لبافی‌نژاد تهران

دکتر نسترن اصغری مقدم[۱]، رضا رسول‌زاده[۲]، دکتر سید محمد مهدی حسینی مقدم[۳]، دکتر مهناز سیفی[۴]، دکتر محمدرضا پورشفیع[۵]، دکتر ملیحه طالبی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: عفونت مجاری ادراری (Urinary tract infection) شایع‌ترین نوع عفونت بیمارستانی می‌باشد. Pseudomonas aeruginosa از علل مهم ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است و مقاومت آنتی بیوتیکی در آن می‌تواند درمان بیماران را با مشکل مواجه نماید. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی P. aeruginosa ایجاد کننده‌ی عفونت مجاری ادراری در بیماران سوندگذاری شده، تعیین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و مشخص نمودن الگوی ژنومی این باکتری انجام شد.

روش‌ها: نمونه‌های ادراریبا استفاده از سرنگ استریل از سوند افراد سوندگذاری شده از ۲ بیمارستان در تهران در یک مطالعه‌ی مقطعی از آذر ۱۳۸۶ تا مرداد ۱۳۸۷ جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌ها با روش لوپ استاندارد کشت داده شدند و در صورت وجود 10^5 CFU/ml باکتری، کشت مثبت در نظر گرفته شد. تشخیص باکتری‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی انجام گرفت و با استفاده از دستورالعمل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف تعیین شد. در مرحله‌ی بعد، سویه‌ها از لحاظ ژنتیکی با استفاده از روش PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۱۱۶ نمونه به لحاظ کشت باکتریایی مثبت بودند. سودوموناس آئروجینوزا ۱۰/۳ درصد نمونه‌ها را شامل شد. از لحاظ مقاومت آنتی بیوتیکی، بیشترین مقاومت نسبت به کاربنی سیلین (۱۰۰ درصد)، سفوتوکسیم (۷۵ درصد) و کوتریموکسازول (۶۶/۷ درصد) مشاهده شد. به لحاظ ژنوتیپی سویه‌ها در هفت تایپ قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: این بررسی مشخص نمود که سویه‌های جدا شده نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها حساسیت داشتند. همچنین سویه‌های مشترک درون بیمارستانی و بین بیمارستانی، منجر به ایجاد عفونت مجاری ادراری در افراد بستری شده‌اند.

واژگان کلیدی: عفونت مجاری ادراری، سوندگذاری، سودوموناس آئروجینوزا، Pulsed- field gel electrophoresis

ارجاع: اصغری مقدم نسترن، رسول‌زاده رضا، حسینی مقدم سید محمد مهدی، سیفی مهناز، پورشفیع محمدرضا، طالبی ملیحه. **جداسازی و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی ژنوتیپی سودوموناس آئروجینوزای مولد عفونت مجاری ادراری در بیماران بستری شده از بیمارستان‌های شهدا و لبافی‌نژاد تهران.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۲ (۲۷۲): ۸-۱

۱- بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های کلیوی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۴- استادیار، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵- استاد، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۶- استادیار، بخش میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر ملیحه طالبی
Email: m-talebi@tums.ac.ir

مقدمه

عفونت مجاری ادراری متداول‌ترین عفونت کسب شده در بیمارستان است و اکثریت موارد عفونت مجاری ادراری بیمارستانی ناشی از سوندگذاری می‌باشد (۱). به طور تقریبی، از هر ۵ بیمار بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه، یک نفر سوندگذاری می‌شود. بنابراین، سوندگذاری در بیمارستان‌ها یک رویداد معمول است (۲). در افراد سوندگذاری شده، احتمال ابتلا به باکتریوری در ازای هر روز ۱۰-۳ درصد افزایش می‌یابد (۳). عفونت مجاری ادراری بیمارستانی نه فقط به خاطر هزینه‌ای که بر بیماران و سیستم بهداشتی اعمال می‌کند، بلکه به خاطر عواقب ناشی از آن، حایز اهمیت است.افراد سوندگذاری شده در بیمارستان‌ها به خاطر وجود سوند و نیز ارگانیسم‌هایی با مقاومت چندگانه به آنتی بیوتیک‌ها، مستعد بروز عفونت مجاری ادراری بیمارستانی هستند(۴). عفونت مجاری ادراری بیمارستانی اغلب شامل ارگانیسم‌هایی می‌گردد که به خاطر مقاومت آنتی بیوتیکی خود، توانایی باقی ماندن در محیط بیمارستان را دارند. ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی در بیمارستان‌ها اغلب همراه با عفونت مجاری ادراری می‌باشد (۵).

Pseudumonas aeruginosa باکتری میله‌ای شکل گرم منفی است که به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب شناخته می‌شود و باعث بیماری‌های مختلفی در انسان می‌گردد. این باکتری به عنوان عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی شناخته می‌شود و مسؤول ۱۰ درصد عفونت‌های ایجاد شده در بیمارستان‌ها است. عفونت‌های ایجاد شده توسط P. aeruginosa اغلب شدید و تهدیدکننده‌ی حیات هستند و اغلب درمان آن‌ها مشکل است، چون حساسیت کمی نسبت به مواد ضد میکروبی و فراوانی بالای ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در حین درمان دارند. بنابراین نتایج حاصل بسیار نامطلوب است (۶).

به این دلیل، بررسی میزان شیوع این باکتری در عفونت مجاری ادراری بیمارستانی و همچنین ارزیابی الگوهای ژنوتیپی و فنوتیپی باکتری‌های به دست آمده، می‌تواند به درک بهتر ما درباره‌ی میزان شیوع سویه‌های مشابه در بیماران بستری کمک نماید. برای ارزیابی تفاوت‌های ژنومی در بین دودمان‌های مختلف یا کلنی‌های یک جنس، چندین تکنیک مختلف را می‌توان استفاده کرد که برای انتخاب روش‌های اپیدمیولوژی مولکولی باید به چندین عامل توجه کرد. این عوامل شامل قابلیت تکرار، قدرت تمایز، آسان بودن اجرا وتفسیر نتایج می‌باشد. از میان تکنیک‌های مولکولی، PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) دارای تکرار پذیری (Repetitively) و قدرت تمایز عالی است که آن را برای بررسی اپیدمیولوژیک عفونت‌ها به عنوان یکی از مناسب‌ترین روش‌ها مطرح می‌سازد و به طور تقریبی تمام باکتری‌های پاتوژن را می‌توان با این روش مورد مطالعه قرار داد(۸-۷). با توجه به اینکه این تکنیک به طور مستقیم به ترادف نوکلئوتیدی موجود در ژنوم مربوط می‌شود، بنابراین الگوی باندینگ یکسان حاصل از این روش در بین سویه‌ها، نشان دهنده‌ی یکسان بودن سویه‌ها است که می‌تواند در ارزیابی ارتباط بین ارگانیسم‌ها که در بسیاری از موارد ضروری است، مورد استفاده قرار گیرد (۹).

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: از آذر ۱۳۸۹ تا مرداد ۱۳۹۰

نمونه‌های ادرار از بیماران بستری دارای سوند مستقر در بیمارستان‌های شهدا و لبافی‌نژاد مطابق با اصول صحیح جمع‌آوری نمونه، از افراد سوندگذاری شده انجام شد. تمام نمونه‌ها در ظروف نگهدارنده‌ی استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه فرستاده شدند. زمان بین گرفتن نمونه و کشت آن ۲ ساعت بود.

تشخیص آزمایشگاهی باکتری‌ها: نمونه‌ها با روش لوپ استاندارد در محیط Blood agar و Macconkey کشت داده شدند. در صورت رشد، در مواردی که رشد یک نوع باکتری با شمارش کلنی‌ها بیش از 10^5 CFU/ml و یا رشد بیش از یک نوع باکتری با تعداد 10^4 CFU/ml برای هر کدام مشاهده شد، کشت ادرار مثبت در نظر گرفته شد (۱۰). جواب منفی بعد از انکوباسیون ۴۸ ساعته در دمای ۳۷ °C گزارش گردید.

در مرحله‌ی بعد، بررسی مورفولوژی و شناسایی باکتری با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های افتراقی بیوشیمیایی صورت پذیرفت. به منظور تشخیص گونه‌های سودوموناس از آزمایش‌های اکسیداز، تخمیر قند، توانایی حرکت، تولید اندول، مصرف سیترات به عنوان منبع کربن، آزمایش متیل رد و تولید استوئین، مصرف اسید آمینه‌ی لیزین و مصرف اوره استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی: تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از دستورالعمل CLSI با روش انتشار از دیسک صورت گرفت. ابتدا از باکتری‌ها محلول ۰/۵ McFarland تهیه شد. سپس از این محلول با استفاده از سواب کشتی روی محیط Müller-Hinton agar تهیه گردید. مطابق با دستورالعملCLSIدیسک‌های آنتی بیوتیکی زیر برای سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا استفاده گردید:

سفتازیدیم (CAZ ،۳۰ µg)، جنتامیسین (GM ،۱۰ µg)، آزلوسیلین (AZ ،۷۵ µg)، آمیکاسین (AK ،۳۰ µg)، سفپیم (CPM ،۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (CIP ،۵ µg)، ایمیپنم (IMI ،۱۰ µg)، توبرامایسین (TN ،۱۰ µg)، سفوتاکسایم (CTX ،۳۰ µg)، کلرامفنیکل (C ،۳۰ µg)، کوتریموکسازول (TS ،۲۵ µg) و کاربنی سیلین (CB ،۱۰۰ µg).

PFGE: در این مطالعه طبق توصیه‌ی شبکه‌ی Pulsenet از ۹۸۱۲ Salmonella choleraesuis serotype branderup H (www.cdc.gov/pulsenet) به عنوان نشانگر استفاده شد.

برای انجام PFGE ابتدا از کشت خالص نمونه‌های باکتری، پلاگ‌هایی با آگارز ۱/۶ درصد تهیه گردید و سپس برای دو ساعت در محلول لیز شماره‌ی ۱ (Tris- HCl ۱ M، Nacl ۵ M، EDTA ۰/۲۵ M، Brig ۵۸ ۱۰ درصد، DOC ۵ درصد، Sarcosin ۱۰ درصد، Rnase A ۵ g/l، H_2O) و در دمای ۳۷ °C قرار گرفت.

هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم XbaI (Roche) به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انجام شد. الکتروفورز با استفاده از دستگاه CHEF DR II (BioRad) و برنامه‌ی زیر انجام گرفت:

در بلاک ۱، تغییر زمان اولیه و نهایی به ترتیب ۲۰ و ۲۵ ثانیه و مدت زمان انجام ۶ ساعت بود. ولتاژ مورد نیاز ۶ ولت بر ثانیه و زاویه‌ی القا شده، ۱۲۰ درجه بود.

در بلاک ۲، تغییر زمان اولیه و نهایی به ترتیب ۲ و ۱۰ ثانیه و مدت زمان انجام ۱۳ ساعت بود. ولتاژ و زاویه‌ی القا نیز همانند مورد ذکر شده در بلاک ۱ بود.

بعد از خاتمه‌ی برنامه، ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در دستگاه Gel documentation بررسی و عکس تهیه شد. بعد از اتمام آزمایش‌های PFGE با استفاده از نرم‌افزار Gelcompar II version ۴/۰ (Applied maths, dice analysis, Sint-Martens-Iatem, Belgium) نتایج تفسیر شد و با استفاده از روش UPGMA (Unweighted pair group arithmetic averages method) دسته‌بندی شدند. خصوصیات ارایه شده هنگامی قابل استناد می‌باشد که حداقل ۱۰ قطعه‌ی مشخص وجود داشته باشد. در صورت وجود قطعات کمتر، توانایی تشخیصی این روش نامشخص است(۱۱).

یافته‌ها

در این پژوهش، ۱۶۳ نمونه به دست آمد. نمونه‌های ارسالی از بیمارستان‌های شهدا و لبافی‌نژاد بودند. از این میان ۴۱ نمونه (۲۵ درصد) از لحاظ رشد منفی بودند. ۲۰ نمونه (۱۲/۳ درصد) دارای رشد مخلوط بودند. در کل، ۱۱۶ نمونه مثبت از نظر عفونت ادراری وجود داشت که در میان آن‌ها رتبه‌ی چهارم فراوانی مربوط به جنس سودوموناس آئروجینوزا با تعداد ۱۲ (۱۰/۳ درصد) بود. از ۱۲ نمونه‌ی جنس سودوموناس، ۸ مورد مربوط به بیمارستان شهدا و ۴ مورد مربوط به بیمارستان لبافی‌نژاد بود.

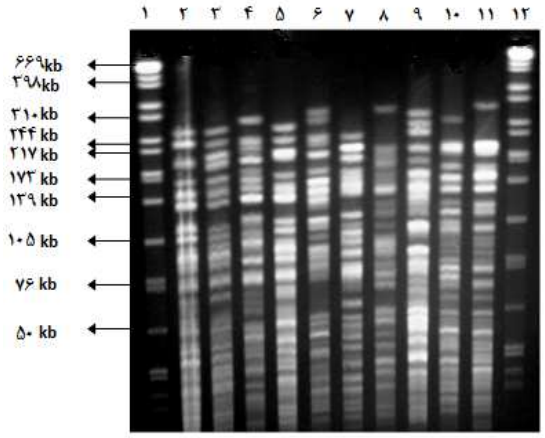
برای بررسی مقاومت سودوموناس از آنتی بیوتیک‌های سفتازیدیم، جنتامیسین، آزلوسیلین، آمیکاسین، سفپیم، سیپروفلوکساسین، ایمیپنم، توبرامایسین، سفوتاکسایم، کلرامفنیکل،کوتریموکسازول و کاربنی سیلین استفاده شد. میزان مقاومت و حساسیت از روی قطر هاله بیان شده و در جدول ۱ آمده است. در این مطالعه، بیشترین مقاومت نسبت به کاربنی سیلین ۱۲ (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. هیچ گونه مقاومتی نسبت به ایمیپنم مشاهده نگردید.

جدول ۱. مقاومت سویه‌های سودوموناس

آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده	تعداد (درصد)
کوتریموکسازول	۸ (۶۶/۷)
کاربنی سیلین	۱۲ (۱۰۰)
سفوتوکسیم	۹ (۷۵/۰)
توبرامایسین	۵ (۴۱/۷)
ایمیپنم	۰ (۰)
کلرامفنیکل	۴ (۳۳/۳)
سیپروفلوکساسین	۴ (۳۳/۳)
آمیکاسین	۴ (۳۳/۳)
جنتامیسین	۴ (۴۱/۷)
سفتازیدیم	۴ (۴۱/۷)
آزلوسیلین	۴ (۴۱/۷)
سفپیم	۴ (۴۱/۷)

آنالیز تمامی ایزوله‌های P. aeruginosa با استفاده از آنزیم XbaI و سیستم CHEF II و مقایسه با نشانگر ۹۸۱۲ Salmonella choleraesuis serotype branderup H در تمام نمونه‌های حاصل از بیمارستان‌های مختلف به طور جداگانه نشان داد که در میان ۱۲ نمونه P. aeruginosa بررسی شده، ۷ تایپ مختلف مشاهده گردید که ۳ تایپ با نمونه‌های مشابه بودند و ۳ تایپ دارای نمونه‌های مشابه از نظر ژنوتیپی بودند. در کل، ۸ سویه در آن وجود داشتند و ۴ سویه‌ی باقی‌مانده دارای قرابت ژنتیکی نبودند. نمونه‌ی باقی‌مانده دارای الگوهای مستقل بود. در میان ۸ سویه‌ی بیمارستان شهدا، ۵ تایپ مختلف مشاهده

گردید که ۵ نمونه دارای تایپ مشابه با تعداد ۲ تا ۳ بودند و ۳ نمونه‌ی باقی‌مانده به صورت منفرد بودند که یکی از این سویه‌ها، الگوی مشابهی با ۲ سویه‌ی دیگر جدا شده از بیمارستان لبافی‌نژاد داشت. نتایج به دست آمده به صورت «تایپ» نشان داده شد و با توجه به معیارهای ارایه شده، طبقه‌بندی شد. در میان ۴ سویه‌ی جدا شده از بیمارستان لبافی‌نژاد، ۳ تایپ مشاهده شد. ۲ نمونه دارای تایپ مشابه و ۲ نمونه‌ی باقی‌مانده دارای تایپ منفرد بودند (شکل ۱).



شکل ۱. الگوهای (Pulsed- field gel electrophoresis) PFGE مشاهده شده‌ی سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا (۱ و ۱۲ نشانگر، ۱۱-۲ سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا؛ نمونه‌های به دست آمده از بیمارستان شهدا: ۱۱، ۱۰، ۶، ۴، ۳ و ۲؛ نمونه‌های به دست آمده از بیمارستان لبافی‌نژاد: ۹، ۸، ۷ و ۵)

بحث

این مطالعه، به منظور مشخص نمودن ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری سودوموناس جدا شده از نمونه‌های ادراری انجام شد. دراین مطالعه، ابتدا از نمونه‌های ارسالی، باکتری‌های ایجاد کننده‌ی عفونت جدا گردید و در مرحله‌ی بعد، نوع آن‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی مشخص شد. سپس به منظور بررسی ویژگی‌های فنوتیپی آن، از آزمایش آنتی بیوگرام استفاده شد و بعد برای مشخص نمودن ویژگی‌های ژنوتیپی از روش PFGE استفاده گردید.

در مطالعه‌ای در ایران، Pseudomonas spp. در رده‌ی چهارم فراوانی قرار گرفته بود (۱۲) که شبیه چنین فراوانی در نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز دیده شد. در مطالعه‌ی دیگری در بیمارستان گلستان ارتش، فراوانی سودوموناس آئروجینوزا ۱۲/۹۸ درصد بود که در کنار کلبسیلا پنومونیه رتبه‌ی دوم باکتری‌های ایجاد کننده‌ی عفونت ادراری را تشکیل داده بود (۱۳).

در میان سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا در بیشتر آنتی بیوتیک‌های آزمایش شده، حساسیت بالای ۵۰ درصد مشاهده شد و تنها در مورد آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول، سفوتاکسیم و کاربنیسیلین مقاومت‌های ۶۶/۷، ۲۵/۰ و ۱۰۰ درصد دیده شد.

در این مطالعه، نتایج حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمیپنم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، سفپیم و جنتامیسین به ترتیب ۱۰۰، ۶۶/۷، ۶۶/۷، ۵۸/۳، ۵۸/۳ و ۵۸/۳ درصدبود. در مقایسه‌ی باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزای به دست آمده از بیماران سوندگذاری شده‌ی ایتالیایی، در مورد آنتی بیوتیک‌های پیش‌گفته، حساسیت مشاهده شده به ترتیب ۷۷، ۸۱، ۴۳، ۶۰، ۶۸ و ۵۷ درصد بوده است(۱۴). در مطالعه‌ای مشابه در انگلستان، میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۵۹ درصد، سفتازیدیم ۱۰ درصد و جنتامیسین ۸۷ درصد گزارش شده است(۱۵).

در این پژوهش، هیچ یک از سویه‌های

سودوموناس آئروجینوزا نسبت به ایمیپنم مقاوم نبوده‌اند. این درحالی است که مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در دنیا ۳۰-۱۰ درصد سویه‌ها به این آنتی بیوتیک مقاوم هستند(۱۶). مطالعه‌ی انجام شده‌ای در این باره در هند نشان داد که ۳۶/۴ درصد سویه‌ها نسبت به ایمیپنم مقاوم بوده‌اند(۱۷).

در بیماران سوندگذاری شده، پاتوژن‌ها به طور کامل در معرض محیط بیمارستانی قرار دارند که تحت تأثیر فشارهای انتخابی توسط آنتی بیوتیک‌ها و نیز مواد آنتی سپتیک هستند(۱۸). بنابراین، عفونت مجاری ادراری بیمارستانی ممکن است مخزنمهمی برای انتخاب و انتقال سویه‌های مقاوم چند دارویی و نیز منبع غالب باکتری‌های گرم منفی در بیماران بستری باشد.

در این بررسی، سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا بیشترین شباهت را با یکدیگر داشتند. از میان ۱۲ سویه‌ی ایزوله شده، ۷ تایپ مختلف دیده شد. در میان سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا، عفونت مجاری ادراری ایجاد شده توسط سویه‌های مرتبط در بخش‌های مختلف و نیز در بیمارستان‌های مختلف قرار گرفته است. عفونت‌های بیمارستانی می‌توانند از فلور نرمال شخص بیمار یعنی منشأ داخلی و یا از طریق منشأ خارجی حاصل شوند که عفونت با منشأ داخلی معمول‌ترین نوع می‌باشد. در چنین مواردی، ممکن است بیمار خود پاتوژن‌ها را به بیمارستان آورده باشد. اما اغلب در طی ۴۸ ساعت اولیه‌ی بستری شدن در بیمارستان، باکتری‌های فلور بیمارستان بر پوست و مخاط بیماران کلونیزه می‌شوند. بعد از این رویداد است که عفونت‌هایی با منشأ داخلی به طور واقعی توسط فلور بیمارستان ایجاد می‌شوند. در اغلب موارد عفونت از بیمار به بیماری دیگر طی فعالیت‌های پزشکی و پرستاری منتقل می‌شود. از عوامل مهم دیگر ایجاد کننده‌ی عفونت بیمارستانی، تجهیزات و وسایل پزشکی مورد استفاده است که انتقال پاتوژن‌ها را به بدن بیماران تسهیل می‌کند (۱۹).

در کل، از مشاهدات صورت گرفته می‌توان نتیجه گرفت که در هر دو بیمارستان مطالعه شده، سویه‌هایی وجود داشتند که توانایی بقا در محیط بیمارستانی و همچنین ایجاد عفونت در بیماران بستری شده را داشتند (به ترتیب ۲ تایپ و ۱ تایپ در بیمارستان‌های شهدا و لبافی‌نژاد). همچنین وجود ۳ سویه با تایپ یکسان در هر دو بیمارستان، نشان دهنده‌ی توانایی زیست بالای این سویه‌ها و نیز انتقال آن‌ها به هر دو بیمارستان است. نتیجه‌ی دیگر این مطالعه شباهت زیاد بین سویه‌های سودوموناس آئروجینوزای ایجاد کننده‌ی عفونت ادراری در بیماران سوندگذاری شده است که تأیید کننده‌ی نتایج ذکر شده در بالا می‌باشد.

References

1. Trautner BW.Management of catheter-associated urinary tract infection. Curr Opin Infect Dis 2010; 23(1): 76-82.
2. Saint S, Meddings JA, Calfee D, Kowalski CP, Krein SL.Catheter-associated urinary tract infection and the Medicare rule changes. Ann Intern Med 2009 16; 150(12): 877-84.
3. Trautner BW, Hull RA, Darouiche RO. Prevention of catheter-associated urinary tract infection. Curr Opin Infect Dis 2005; 18(1): 37-41.
4. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary

tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis. Clin Microbiol Rev 2008; 21(1): 26-59.
5. Tabibian JH, Gornbein J, Heidari A, Dien SL, Lau VH, Chahal P, et al. Uropathogens and host characteristics. J Clin Microbiol 2008; 46(12): 3980-6.
6. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(1): 43-8.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18(6): 426-39.
8. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37(6): 1661-9.
9. Singer RS, Sischo WM, Carpenter TE. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5502-11.
10. Wu AHB. Clinical guide to laboratory tests. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2006. p. 1620-2.
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2233-9.
12. Haghi-Ashteiani M, Sadeghifard N, Abedini M, Soroush S, Taheri-Kalani M. Etiology and antibacterial resistance of bacterial urinary tract infections in children's medical center, Tehran, Iran. Acta Med Iran 2007; 45(2): 153-7.
13. Mohammadimehr M, Feizabadi MM, Bahadori A. Antibiotic resistance pattern of gram negative bacilli caused nosocomial infections in ICUs in Khanevadeh and Golestan Hospital in Tehran- 2007. J Army Univ Med Sci I.R. Iran 2011; 8(4): 283-90. [In Persian].
14. De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, Negrini R, Manca N. Urinary tract infections in Brescia, Italy: etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. Med Sci Monit 2007; 13(6): BR136-BR144.
15. Wazait HD, Patel HR, Veer V, Kelsey M, Van Der Meulen JH, Miller RA, et al. Catheter-associated urinary tract infections: prevalence of uropathogens and pattern of antimicrobial resistance in a UK hospital (1996-2001). BJU Int 2003; 91(9): 806-9.
16. Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. Clin Infect Dis 1997; 25(5): 1094-8.
17. Taneja N, Maharwal S, Sharma M. Imipenem resistance in nonfermenters causing nosocomial urinary tract infections. Indian J Med Sci 2003; 57(7): 294-9.
18. Wagenlehner FM, Naber KG. Current challenges in the treatment of complicated urinary tract infections and prostatitis. Clin Microbiol Infect 2006; 12 Suppl 3: 67-80.
19. Kayser FH, Bienz BW, Eckert J, Zinkernagel RM. Medical microbiology. New York, NY: Thiem; 2004. p. 320-73.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 06.11.2013
Vol. 32, No. 272, 1st Week, April 2014
Accepted: 01.02.2014

Isolation, Antibiotic Resistance Determination and Genotypic Analysis of *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Causing Urinary Tract Infection in Catheterized Patients of Shohada and Labafi Nejad Hospitals, Tehran, Iran

Nastaran Asghari-MoghadamPhD[1], Reza Rasoolzadeh MSc[2], Seyyed Mohamad-Mahdi Hoseini-Moghadam MD[3], Mahnaz Seifi PhD[4], Mohamad Reza Pour-Shafie PhD[5], Maliheh Talebi PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: Urinary tract infection is the most common nosocomial infection worldwide. Microorganisms causing urinary tract infections are resistant to most of the antibiotics. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is one of the major causes of nosocomial infections and its antibiotic resistance leads to medical implications associated with urinary tract infections. The aim of this study was to assess the prevalence of *P. aeruginosa* strains to identify their in-vitro susceptibility to antimicrobial agents and to determine genetic diversity of them.

Methods: Urine samples were obtained from catheterized patients in Shohada and Labafi Nejad hospitals, Tehran, Iran, and cultured by standard loop method. The cultures with more than 10^5 CFU/ml were assumed as positive. After identification of bacterial species by biochemical tests, susceptibility of each isolate was assessed by disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. In order to analyze bacterial genotypic diversity, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed.

Findings: 116 out of 163 urine samples were positive for bacterial isolates. *Pseudomonas* species were placed in third step of the most frequent isolates. Antibiotic sensitivity was observed against most of antimicrobial agents. Some of strains were genetically similar.

Conclusion: This study revealed that isolated strains were sensitive to wide range of antibiotic agents. In addition, common type strains were responsible of causing inter- and intra-hospital urinary tract infections in catheterized patients.

Keywords: Urinary tract infection, Catheterization, *Pseudomonas aeruginosa*, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Citation: Asghari Moghadam N, Rasoolzadeh R, Hoseini Moghadam SMM, Seifi M, Pour-Shafie MR, Talebi M. **Isolation, Antibiotic Resistance Determination and Genotypic Analysis of Pseudomonas Aeruginosa Strains Causing Urinary Tract Infection in Catheterized Patients of Shohada and Labafi Nejad Hospitals, Tehran, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(244): 1-8

1- Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- PhD Student, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Urology and Nephrology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Tuberculosis, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5- Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
6- Assistant Professor, Department of Microbiology, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
Corresponding Author: Maliheh Talebi PhD, Email: m-talebi@tums.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/ شماره ۲۷۲/ هفته اول فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۳

بررسی اثر تستوسترون بر میانگین غلظت عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و عامل رشد فیبروبلاستی بازی (bFGF) در رت‌های ویستار نر

فرید نصر اصفهانی[۱]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۲]، مریم مؤتمر[۱]، سعیده بحرانی[۱]، زهراالسادات مرتضوی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: رگ‌زایی پدیده‌ای تعیین کننده در درمان بیماری‌های قلبی است. هدف از این مطالعه، تعیین اثر تستوسترون بر روی غلظت عامل رشد مشتق از پلاکت و عامل رشد فیبروبلاستی بازی به عنوان عوامل محرک رگ‌زایی در خون رت‌های نر بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۲۴ عدد رت نر به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول تحت عمل جراحی شم (ایجاد برش جراحی بدون دستکاری) و گروه‌های دوم و سوم و چهارم تحت عمل ارکیدکتومی قرار گرفتند. به گروه اول و دوم روزانه ۰/۱ ml روغن کنجد (به عنوان دارونما)، به گروه سوم ۱ mg/kg/day تستوسترون و به گروه چهارم ۵ mg/kg/day تستوسترون روزانه تزریق شد. پس از ۲۱ روز تزریق، غلظت سرمی عوامل PDGF (Platelet derived growth factor) و bFGF (Basic fibroblastic growths factor) در خون رت‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت سرمی PDGF رت‌های تیمار شده با ۵ mg/kg/day تستوسترون، نسبت به رت‌های ارکیدکتومی تیمار شده با روغن کنجد و ۱ mg/kg/day تستوسترون بیشتر بود ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین غلظت bFGF در خون گروه دریافت کننده‌ی ۱ mg/kg/day تستوسترون کمتر از سایر گروه‌ها بود ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: کاهش تستوسترون باعث کاهش PDGF می‌شود و ممکن است از این طریق به صورت بالقوه در کاهش توان آنژیوژنز مؤثر باشد. تغییر غلظت تستوسترون تأثیری بر تغییر غلظت سرمی bFGF ندارد.

واژگان کلیدی: عامل رشد مشتق از پلاکت، عامل رشد فیبروبلاستی بازی، تستوسترون، آنژیوژنز

ارجاع: نصر اصفهانی فرید، حق‌جوی جوانمرد شقایق، مؤتمر مریم، بحرانی سعیده، مرتضوی زهراالسادات. **بررسی اثر تستوسترون بر میانگین غلظت عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و عامل رشد فیبروبلاستی بازی (bFGF) در رت‌های ویستار نر.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۲ (۲۷۲): ۱۵-۹

مقدمه

در ۴ دهه‌ی اخیر، به دلیل پیشرفت‌هایی که در بهداشت جهانی و شناسایی بیماری‌های قلبی- عروقی حاصل شده است، میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی- عروقی کاهش یافته است (۲-۱). با این وجود، این بیماری‌ها هنوز باعث مرگ یک سوم افراد بالای ۳۵ سال می‌شوند که ۸۰ درصد آن‌ها در کشورهای با درآمد متوسط و پایین رخ می‌دهد (۴-۳).

۱- دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی پژوهش‌های دانشجویان، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد
Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

در مدل‌های حیوانی اثبات شده است که استروژن و به خصوص ۱۷- بتا استرادیول، نقش حفاظتی بر روی سیستم قلبی- عروقی دارند (۵). بسیاری از این تأثیرات به طور مستقیم از طریق رگ‌زایی و با واسطه‌ی مکانیسم‌های تحریک عروق است (۶). نقش تستوسترون در بازسازی برخی بافت‌ها مانند بافت عضلانی و استخوان کشف شده است (۷)؛ اما نقش آن در بازسازی عروق و رگ‌زایی هنوز مورد بررسی دقیق قرار نگرفته است (۸). با توجه به شیوع بیشتر بیماری‌های قلبی- عروقی در مردان نسبت به زنان ،تصور می‌شود که تستوسترون اثر منفی بر سیستم عروقی دارد؛ اما داده‌های کلینیکی جدید، نقش تستوسترون را در بروز بیماری‌های قلبی- عروقی کم‌رنگ می‌کند (۹).

عامل رشد فیبروبلاستی پایه که یکی از مهم‌ترین عوامل رگ‌زایی است، از پلاکت‌ها، ماکروفاژهای فعال شده و سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی (EPC یا Endothelial progenitor cell) آزاد و باعث تشکیل عروق خونی جدید می‌شود. bFGF (Basic fibroblastic growths factor) با تأثیر روی سلول‌های ماهیچه‌ای صاف و اندوتلیال، آنژیوژنز را القا می‌کند، همچنین این عامل به تکثیر فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال کمک می‌کند (۱۱-۱۰).

عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF یا Platelet derived growth factor) روی رشد، مهاجرت و عملکرد سلول‌های مزانشیمی در شرایط In vitro نقش دارد (۱۲). PDGF رشد و بلوغ رگ را در طی ایسکمی قلب تحریک می‌کند (۱۳). عامل رشد اندوتلیال عروق (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) که توسط بسیاری از سلول‌ها ترشح می‌شود و به وسیله‌ی بسیاری از سیتوکین‌ها مانند PDGF تنظیم می‌شود، در فعال کردن تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل مویرگ نقش دارد (۱۴). همچنین PDGF به وسیله‌ی افزایش رشد و بلوغ عروق در تحریک ساخت عروق جدید در ایسکمی اندام‌های انتهایی مؤثر است (۱۷-۱۵). در بعضی مطالعات نیز نشان داده شده است که افزایش مقدار PDGF و بیان ژن رسپتور آن توسط EPCها، موجب می‌گردد که محور PDGF/PDGFR (Platelet derived growth factor-Platelet derived growth factor receptor) به عنوان عامل مؤثری در آنژیوژنز مطرح گردد (۲۰-۱۸). همچنین EPC به عنوان عامل مؤثر در ترشح پاراکرین PDGF در شرایط هایپوکسیک نیز مطرح گردیده است (۲۱).

با توجه به نقش مؤثر عوامل PDGF و bFGF بر رشد و بلوغ عروق و همچنین تسریع بهبود ایسکمی قلبی، در این مطالعه اثرات هورمون تستوسترون بر روی مقدار ترشح این عوامل سنجیده شد. پس از نمونه‌گیری از خون موش‌های تیمار شده با تستوسترون، به منظور ارزیابی این هورمون در میزان و نحوه‌ی اثر آن بر رگ‌زایی، میزان عوامل PDGF و bFGF به کمک کیت الایزا اندازه‌گیری شد.

روش‌ها

در ابتدا تعداد ۲۴ رت نر از نژاد ویستار از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. پس از انتقال به اصفهان، رت‌ها به مدت ۲ هفته تحت شرایط استاندارد در لانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت عادت به شرایط جدید

نگهداری شدند (۲۲). رت‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. پس از بیهوش نمودن رت‌ها توسط کتامین ۱۰ درصد (Alfasan)و زایلازین ۲ درصد (Alfasan) داخل صفاقی، ۳ گروه از رت‌ها تحت عمل خارج کردن بیضه‌ها (OCX یا Orchiectomy) و ۱ گروه دیگر تحت عمل شم (ایجاد برش جراحی بدون دستکاری) قرار گرفتند (۲۳).

در عمل ارکیدکتومی، ابتدا رت‌ها به پشت خوابانده شدند. با ایجاد ۱ شکاف در قسمت میانی ناحیه‌ی اسکروتوم، بیضه‌ها خارج شدند و سپس شکاف، با نخ بخیه‌ی ۰۶ بخیه زده شد. در عمل جراحی شم، رت‌ها به پشت خوابانده شدند و با ایجاد شکافی بر روی ناحیه‌ی اسکروتوم، برشی شبیه عمل ارکیدکتومی ایجاد شد و سپس بدون خارج کردن بیضه‌ها شکاف با نخ بخیه ۰۶ بخیه زده شد (۲۴).

پس از عمل در ۳ نوبت ۰/۲ میلی‌لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین به صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد. ۲ هفته پس از عمل، رت‌ها تحت تیمار با تستوسترون قرار گرفتند. ۱ گروه از رت‌های ارکیدکتومی شده دوز ۵ میلی‌گرم تستوسترون محلول در روغن کنجد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت روزانه، ۱ گروه دیگر دوز ۱ میلی‌گرم تستوسترون محلول در روغن کنجد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت روزانه و به یک گروه دیگر ۰/۱ میلی‌لیتر در روز روغن کنجد به عنوان دارونما به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی پشت تزریق شد. همچنین به گروه شم، ۰/۱ میلی‌لیتر در روز روغن کنجد به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی پشت تزریق شد. این تزریقات به مدت ۲۱ روز ادامه داشت (۲۵).

۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، رت‌ها ابتدا توسط کتامین ۱۰ درصد (Alfasan) و زایلازین ۲ درصد (Alfasan) داخل صفاقی بیهوش شدند و سپس طبق شرایط استاندارد کشته شدند. ۵ میلی‌لیتر خون از قلب رت‌ها توسط سرنگ گرفته شد. پس از خون‌گیری، نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ جهت تهیه‌ی سوپرناتانت، سانتریفوژ شدند (۲۶). سوپرناتانت‌های تهیه شده به آزماشگاه مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان فرستاده شدند. مقدار PDGF و bFGF در خون رت‌ها توسط کیت الایزا اندازه‌گیری شد و سپس مقدار غلظت‌ها توسط دستگاه Spectrophotometer اندازه‌گیری شد.

داده‌های مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) و با آزمون آماری One-way analysis of variance (One-way ANOVA) آنالیز شدند. مقدار خطای نوع اول مورد قبول در این مطالعه ۰/۰۵۰ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، رت‌ها کشته شدند و سوپرناتانت خون آن‌ها استخراج گردید. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، سطح PDGF و bFGF سرم آن‌ها با استفاده از آزمایش الایزا اندازه‌گیری شد.

تعداد ۲۴ رت نر از نژاد ویستار در ۴ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. نتایج حاصل پس از تزریق ۲۱ روز تستوسترون در جدول ۱ آمده است.

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، کاهش غلظت تستوسترون در گروه ارکیدکتومی شده‌ی تحت تزریق با روغن کنجد به علت خارج کردن منبع داخلی

تستوسترون موجب کاهش معنی‌داری در غلظت PDGF سرم نسبت به گروه شم شد (P < ۰/۰۵۰). همچنین رت‌های تیمار شده با دوز ۵ mg/kg/day، افزایش معنی‌داری در غلظت PDGF سرمی نسبت به گروه ارکیدکتومی شده‌ی تحت تزریق با روغن کنجد داشت. میانگین غلظت PDGF در گروه تحت تزریق با ۱ mg/kg/day بیشتر از گروه ارکیدکتومی شده‌ی تحت تزریق با روغن کنجد و کمتر از گروه تحت تزریق با ۵ mg/kg/day بود که این تفاوت به سطح معنی‌داری نزدیک می‌باشد (P = ۰/۰۵۰).

همان‌گونه که در جدول ۱ آمده است، تزریق تستوسترون با دوز ۱ mg/kg/day باعث کاهش معنی‌دار bFGF در خون رت‌ها در مقایسه با گروه ارکیدکتومی شده‌ی تحت تزریق با روغن کنجد شد (P < ۰/۰۵۰)، اما تزریق تستوسترون با دوز ۵ mg/kg/day تفاوت معنی‌داری با میزان bFGF خون رت‌های گروه ارکیدکتومی شده‌ی تحت تزریق با روغن کنجد نداشت. همچنین تفاوت معنی‌داری میان گروه ارکیدکتومی تیمار شده با روغن کنجد و گروه شم و گروه ارکیدکتومی تیمار شده با تستوسترون ۵ mg/kg/day دیده نشد.

بحث

عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF) و عامل رشد فیبروبلاست بازی (bFGF) از مهم‌ترین عوامل مؤثر در آنژیوژنز و نئوواسکولوژنز می‌باشند. PDGF رشد و بلوغ رگ را در طی ایسکمی قلب تحریک می‌کند و موجب فعال شدن تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و ایجاد مویرگ‌های جدید می‌شود (۱۲، ۱۰، ۸-۷).

تعدادی مطالعه نشانگر بیان رسپتور PDGF توسط EPCها می‌باشد که این سلول‌ها عاملی مؤثر در آنژیوژنز هستند. با وجود این که EPCها گیرنده‌ی آندروژن را بر سطح خود بیان می‌کنند، اما مکانیسم اثر تستوسترون بر روی این سلول‌ها همچنان نامشخص است و مطالعات محدودی در رابطه با عوامل رشد مؤثر همچون PDGF صورت گرفته است.

در مطالعه‌ی حاضر غلظت PDGF سرم خون رت‌های نر در گروه ارکیدکتومی شده‌ی تحت تزریق با روغن کنجد که هیچ گونه آندروژن اعم از درون‌زاد و برون‌زاد را نداشتند، به صورت معنی‌داری از سایر گروه‌ها کمتر بود.

جدول ۱. مقایسه‌ی میانگین غلظت Platelet derived growth factor (PDGF) و Basic fibroblastic growths factor (bFGF) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	غلظت PDGF (ng/ml)	غلظت bFGF (ng/ml)
شم- روغن کنجد	۶۸۱/۸ ± ۲۳۳/۶*	۴۹/۰ ± ۴/۴
اورکیدکتومی- روغن کنجد	۲۰۱/۴ ± ۱۶۳/۸	۵۰/۰ ± ۲/۹
اورکیدکتومی-mg ۱ تستوسترون	۳۴۵/۹ ± ۲۶۶/۵	۴۳/۵ ± ۱/۱
اورکیدکتومی-mg ۵ تستوسترون	۴۷۸/۶ ± ۶۲/۶	۴۸/۶ ± ۱/۵

* داده‌های این جدول به صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه شده‌اند.

PDGF: Platelet derived growth factor; bFGF: Basic fibroblastic growths factor

همچنین رت‌های نر تیمار شده با دوز بالای ۵ میلی‌گرم تستوسترون به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت روزانه، با افزایش فزاینده‌ای از PDGF مواجه شدند که البته این افزایش غلظت نسبت به رت‌های دارای تستوسترون درون‌زاد (شم) کمتر بود.

در واقع، این مطالعه بیانگر اثر مثبت تستوسترون روی عوامل مؤثر در مهاجرت بافتی و ترمیم عروق همچون PDGF می‌باشد. Antus و همکاران نشان دادند که تزریق تستوسترون در رت‌های عقیم با افزایش سطح mRNA زنجیره‌ی عامل PDGF، سطح سرمی این عامل را افزایش می‌دهد که مطابق با یافته‌های این پژوهش می‌باشد (۲۷).

مطالعه‌ای که توسط Kolodgie و همکاران انجام شد، نشان می‌دهد که افزایش هورمون تستوسترون بر اندوتلیوم مؤثر است که این تحریک سلولی به واسطه‌ی عامل رشد PDGF نمی‌باشد (۲۸).

علاوه بر این، عامل رگ‌زایی دیگر bFGF می‌باشد که از سلول‌های مختلفی آزاد و موجب واسکولوژنز می‌شود (۷). با این وجود، نتایج مطالعه‌ی حاضر بیان کننده‌ی عدم ارتباط معنی‌دار بین تزریق تستوسترون و غلظت سرمی bFGF در رت‌های نر می‌باشد. یکی از محدودیت‌های این طرح، عدم اندازه‌گیری سطح پایه‌ی تستوسترون است. توصیه می‌شود در طرح‌های آتی، این مشکل به نحوی رفع گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تزریق تستوسترون به رت‌های نر، موجب افزایش غلظت سرمی PDGF به عنوان یکی از عوامل مهم آنژیوژنز و به احتمال زیاد واسطه‌ی مهاجرت EPCها در ترمیم عروق می‌شود. این در حالی است که تستوسترون درون‌زاد رت‌ها اثر مساعدتری نسبت به دوز بالای تستوسترون برون‌زاد بر روی غلظت PDGF دارد؛ از این رو به نظر می‌رسد که تستوسترون اثر مثبتی بر روی درمان و پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی دارد. همچنین مطابق با یافته‌های این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین هورمون تستوسترون و غلظت bFGF مشاهده نشد.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر از مسؤولان و کارشناسان مرکز تحقیقات فیزیولوژی، بدین‌وسیله از کمک‌های بی‌دریغ آقایان فریدون حق‌دوست و علیرضا زندی‌فر که ما را در کلیه‌ی مراحل این پژوهش یاری کردند، صمیمانه سپاس‌گزاری می‌نماییم.

References

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation 2008; 117(4): e25-146.
2. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet 1997; 349(9061): 1269-76.
3. Brundtland GH. From the World Health Organization. Mental health: new understanding, new hope. JAMA 2001; 286(19): 2391.
4. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De SG, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. Circulation 2010; 121(7): 948-54.
5. Losordo DW, Isner JM. Estrogen and angiogenesis: A review. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21(1): 6-12.
6. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. FASEB J 1996; 10(5): 615-24.
7. Harman SM. Testosterone in older men after the

Institute of Medicine Report: where do we go from here? Climacteric 2005; 8(2): 124-35.
8. Sieveking DP, Lim P, Chow RW, Dunn LL, Bao S, McGrath KC, et al. A sex-specific role for androgens in angiogenesis. J Exp Med 2010; 207(2): 345-52.
9. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection? Int J Cardiol 2009; 136(2): 200-10.
10. Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. J Wound Care 2009; 18(12): 516-9.
11. Chen JL, Fan J, Chen MX, Dong Y, Gu JZ. Effect of non-anticoagulant N-desulfated heparin on basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and metastasis of gastric carcinoma in vitro and in vivo. Gastroenterol Res Pract 2012; 2012: 752940.
12. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. Genes Dev 1994; 8(16): 1875-87.
13. Tabibiazar R, Rockson SG. Angiogenesis and the ischaemic heart. Eur Heart J 2001; 22(11): 903-18.
14. Fan Y, Yang GY. Therapeutic angiogenesis for brain ischemia: a brief review. J Neuroimmune Pharmacol 2007; 2(3): 284-9.
15. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. Nat Biotechnol 2001; 19(11): 1029-34.
16. Hao X, Mansson-Broberg A, Gustafsson T, Grinnemo KH, Blomberg P, Siddiqui AJ, et al. Angiogenic effects of dual gene transfer of bFGF and PDGF-BB after myocardial infarction. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315(4): 1058-63.
17. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. Nat Med 2003; 9(5): 604-13.
18. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ Res 2008; 103(11): 1204-19.
19. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. J Mol Cell Cardiol 2005; 39(5): 733-42.
20. Di SS, Yang Z, Wyler von BM, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, et al. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. PLoS One 2009; 4(5): e5643.
21. Wyler von BM, Yang Z, Volzmann J, Baumgartner I, Kalka C, Di SS. Endothelial progenitor cells induce a phenotype shift in differentiated endothelial cells towards PDGF/PDGFRbeta axis-mediated angiogenesis. PLoS One 2010; 5(11): e14107.
22. Shamberger RC, Thistlethwaite PA, Thibault LE, Talbot TL, Brennan MF. The effect of testosterone propionate on wound healing in normal and castrate rats. J Surg Res 1982; 33(1): 58-68.
23. Hart CY, Burnett JC, Jr., Redfield MM. Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 281(5): H1938-H1945.
24. Castro JE. Orchidectomy and the immune response. II. Response of orchidectomized mice to antigens. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1974; 185(81): 437-51.
25. Pluchino N, Ninni F, Casarosa E, Lenzi E, Begliuomini S, Cela V, et al. Sexually dimorphic effects of testosterone administration on brain allopregnanolone in gonadectomized rats. J Sex Med 2008; 5(12): 2780-92.
26. Quanhong L, Caili F, Yukui R, Guanghui H, Tongyi C. Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. Plant Foods Hum Nutr 2005; 60(1): 13-6.
27. Antus B, Yao Y, Song E, Liu S, Lutz J, Heemann U. Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. Transpl Int 2002; 15(9-10): 494-501.
28. Kolodgie FD, Jacob A, Wilson PS, Carlson GC, Farb A, Verma A, et al. Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. Am J Pathol 1996; 148(3): 969-76.

Journal of Isfahan Medical School Received: 11.11.2013

Vol. 32, No. 272, 1st Week, April 2014 Accepted: 02.02.2014

Determination of the Testosterone Effect on the Average Concentration of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and Platelet-Drived Growth Factor (PDGF) in Male Wistar Rats

Farid Nasr-Esfahani[1], Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD[2], Maryam Motamer[1], Zahra Sadat Mortazavi[1], Saeideh Bahrani[1]

Original Article

Abstract

Background: Angiogenesis is a determinant factor in the treatment of cardiovascular diseases. The purpose of this study was determining the effect of testosterone on the average concentration of basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) as angiogenic stimulating factors in the blood of male rats.

Methods: In this experimental study, 24 male rats were divided into 4 groups. The first group went under sham surgery (making incisions without doing any special work on rats' bodies) and 3 others went under the orchiectomy (OCX). The first and second groups received 0.1 mg/day sesame oil as placebo and the third and fourth groups received 1 and 5 mg/kg/day testosterone, respectively. After 21 days, the concentrations of bFGF and PDGF were measured in rats blood.

Findings: The mean concentration of PDGF in rats in forth group was significantly more than those in third group ($P < 0.05$). In addition, the mean concentration of bFGF in third group was significantly less than the others ($P < 0/05$).

Conclusion: Reduction of testosterone causes reduction of PDGF and it may be effective on decreasing the angiogenesis potentially. Different levels of testosterone had no effect on bFGF concentration.

Keywords: Basic fibroblast growth factor, Platelet-derived growth factor, Testosterone, Angiogenesis

Citation: Nasr-Esfahani F, Haghjooy-Javanmard Sh, Motamer M, Mortazavi ZS, Bahrani S. **Determination of the Testosterone Effect on the Average Concentration of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and Platelet-Drived Growth Factor (PDGF) in Male Wistar Rats**. J Isfahan Med Sch 2014; 32(272): 9-15

1- Student of Medicine, Medical Students Research Committee, School of Medicine AND Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Physiology Research Center AND Department of Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD, Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۲/هفته اول فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۹

بررسی تأثیر درمان فاز اول بیماری پریودنتال بر فراوانی تولد نوزادان زودرس و با وزن کم در مادران باردار مبتلا به بیماری پریودنتال

دکتر محمد رضا ناصح[۱]، دکتر آذین وحید[۲]، دکتر نازنین زنگنه[۳]، دکتر فاطمه لالوها[۴]، دکتر مرضیه رضایی[۵]، دکتر نوید محمدی[۶]، فرحناز رضایی[۷]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی میزان تأثیر درمان پریودنتال بر وقوع نوزادان نارس و با وزن کم در مادران باردار مبتلا به پریودنتیت خفیف تا متوسط بود.

روش‌ها: برای ۶۰ بیمار شرکت کننده در مطالعه، معاینات پریودنتال شامل اندازه‌گیری عمق پاکت (PD یا Probing depth)، میزان از دست رفتن چسبندگی بافت‌های پریودنتال (CAL یا Clinical attachment level) و نیز خونریزی هنگام پروب کردن (BOP یا Bleeding on probing) ثبت شد. پس از آن، گروه مورد (شامل ۳۰ بیمار) تحت درمان پریودنتال شامل آموزش بهداشت، جرمگیری و تسطیح سطح ریشه در شروع مطالعه و در انتهای ماه هشتم بارداری قرار گرفتند. برای گروه شاهد (شامل ۳۰ نفر) تنها شاخص‌های پریودنتال ثبت گردید.

یافته‌ها: وقوع نوزادان با وزن کم و نارس در گروه مورد به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کمتر بود (P = ۰/۰۰۶) و هیچ گونه ارتباطی بین شاخص‌های کلینیکی اندازه‌گیری شده با مدت زمان بارداری و یا وزن نوزادان ملاحظه نشد. از طرفی، یک ارتباط مثبت و ضعیف بین وزن نوزادان با بهبود شاخص‌های پریودنتال مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه از این فرضیه که پریودنتیت مادران باردار عاملی جهت به دنیا آوردن نوزادان با وزن کم و نارس در نمونه‌های مطالعه‌ی حاضر می‌باشد، حمایت می‌کند. بنابراین درمان پریودنتال در مادران مبتلا به پریودنتیت می‌تواند به کاهش مشکلات حین بارداری و افزایش وزن نوزادان کمک نماید و باعث می‌شود تا نوزادان در زمان طبیعی به دنیا بیایند.

واژگان کلیدی: بیماری پریودنتال، حاملگی، تولد با وزن کم، نارس

ارجاع: ناصح محمد رضا، وحید آذین، زنگنه نازنین، لالوها فاطمه، رضایی مرضیه، محمدی نوید، رضایی فرحناز. **بررسی تأثیر درمان فاز اول بیماری پریودنتال بر فراوانی تولد نوزادان زودرس و با وزن کم در مادران باردار مبتلا به بیماری پریودنتال.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۲): ۲۴-۱۶

۱- استادیار، گروه پریودنتیکس، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲- دندانپزشک، قزوین، ایران
۳- دستیار تخصصی، گروه کودکان، دانشکده‌ی دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه بیماری‌های زنان و زایمان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۵- متخصص بیماری‌های زنان و زایمان، اصفهان، ایران
۶- دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۷- مرکز بهداشت شماره‌ی ۲، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر نازنین زنگنه
Email: den_zangeneh@yahoo.com

مقدمه

بیماری پریودنتال یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انسان است که با از دست رفتن چسبندگی بافت‌های پریودنتال مشخص می‌شود (۲-۱). این بیماری منشأ عفونی دارد و در تظاهر به عوامل باکتریال و فراورده‌های آن‌ها، بافت لثه و در ادامه بافت‌های نگهدارنده‌ی دندان دچار تخریب خواهند شد. این امر، با افزایش مدیاتورهای آماسی ناشی از واکنش‌های ایمنی اتفاق می‌افتد (۲-۱). سایتوکائین‌های پیش التهابی نظیر IL۶ (Interleukin۶)، IL۱ß (Interleukin-۱ beta) و TNFα (Tumor necrosis factor alpha) در بافت و مایع شیار لثه افزایش پیدا می‌کند و میزان PGE۲ (Prostaglandin E۲) نیز به موازات دیگر سایتوکائین‌ها بالا خواهد رفت و این سایتوکائین‌ها باعث ایجاد تخریب استخوان خواهند شد (۳). بیماری پریودنتال به دلیل تغییرات هورمونال ایجاد شده در دوران بارداری به طور مشخص افزایش می‌یابد؛ زیرا که بافت لثه، بافت هدف برای هورمون‌های جنسی نظیر استروژن و پروژسترون است (۴). تغییرات التهابی در بافت لثه‌ی زنان باردار از اوایل ماه دوم بارداری شروع می‌شود و تا انتهای ماه هشتم افزایش می‌یابد و پس از آن کاهش می‌یابد و تا دو ماه پس از زایمان بهبود چشمگیری خواهد یافت (۴). زایمان طبیعی پس از گذشت حدود ۴۰ هفته و با رشد کامل نوزاد اتفاق می‌افتد. چنانچه زایمان زودتر از ۳۷ هفته و وزن بچه کمتر از ۲۵۰۰ gr باشد، به آن زایمان زودرس و با وزن کم می‌گویند (۵).

یکی از دلایل مهم در فیزیولوژی زایمان طبیعی، افزایش میزان PGE۲ مایع آمنیوتیک می‌باشد و با رسیدن میزان این پروستاگلاندین به مقدار لازم، زایمان و انقباضات رحمی رخ خواهد داد (۳).

در فرایند بیماری پریودنتال نیز میزان PGE۲ مایع شیار لثه و بافت لثه‌ای افزایش می‌یابد. چندی از مطالعات انجام پذیرفته در این خصوص نشان داده‌اند که میزان PGE۲ مایع شیار لثه‌ای با میزان آن در مایع آمنیوتیک ارتباط خطی و مثبت دارد و این می‌تواند نشان دهنده‌ی نقش احتمالی بیماری‌های لثه‌ای در ایجاد زایمان‌های زودرس باشد (۷-۶، ۳، ۱).

مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی نقش بیماری پریودنتال در شیوع نوزادان نارس و با وزن کم به انجام رسید.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی یک سو کور (Single blind clinical trial) و از نوع مداخله‌ای (Interventional) بود که در دو گروه خانم‌های باردار مبتلا به بیماری پریودنتال به انجام رسید. در ابتدای مطالعه، ۱۲۰ مادر باردار مبتلا به بیماری پریودنتال مراجعه کننده به مطب خصوصی متخصص زنان انتخاب شدند، اما پس از معاینه‌ی بیماران توسط متخصص بیماری‌های لثه، ۹۰ زن باردار دارای بیماری پریودنتال خفیف تا متوسط تأیید شدند و تا انتهای مطالعه، این تعداد به ۶۰ نفر کاهش یافت. لازم بود تمامی بیماران حداقل هفته‌ی چهارده حاملگی را سپری کرده باشند و دارای حد اقل بیست دندان در دهانشان باشند و طی شش ماه گذشته، تحت درمان بیماری پریودنتال قرار نگرفته باشند.

در گروه مورد (۳۰ نفر)، جرمگیری و تسطیح

سطح ریشه (توسط دستگاه اولتراسونیک از نوع پیزوالکتریک Wood paker در ابتدای مطالعه و در انتهای ماه هشتم به انجام رسید. در بیماران از هیچ گونه آنتی سپتیک (دهان‌شویه)، آنتی بیوتیک و یا دارویی به عنوان مکمل درمان استفاده نشد. در گروه شاهد، هیچ گونه درمانی انجام نشد.

همچنین شاخص‌های پریودنتال پروب Williams از جمله عمق پاکت (PD یا Probing depth)، میزان از دست رفتن چسبندگی بافت‌های پریودنتال (CAL یا Clinical attachment level) و نیز خونریزی هنگام پروب کردن (BOP یا Bleeding on probing) و به صورت چهار نقطه‌ای و در تمامی دندان‌های بیماران در گروه‌های شاهد و مورد در شروع مطالعه و در انتهای ماه هشتم انجام شد.

زنان دارای خونریزی واژینال در سه ماه اول حاملگی، سابقه‌ی مصرف سیگار، سابقه‌ی زایمان زودرس و یا سقط جنین، نارسایی Cervix (طول کوتاه‌تر از ۲۵ mm) و بیماری سیستمیک (دیابت، قلبی- عروقی) از مطالعه خارج شدند.

لازم به ذکر است افرادی که میزان از دست رفتن چسبندگی آن‌ها بین ۲-۱ mm باشد، دچار Mild preiodontitis و افرادی که میزان LA (Loss of attachment) آن‌ها بین ۴-۳ mm باشد، دچار Moderate preiodontitis و افرادی که LOA آن‌ها بیشتر از ۵ mm باشد، دچار Severe preiodontitis می‌باشند.

تمامی آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۲ (version 12, SPSS Inc., Chicago, IL) به انجام رسید. جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌های مطالعه، از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده گردید. همچنین جهت آنالیز بین گروهی به منظور مشخص نمودن معنی‌دار بودن اختلاف دو گروه جهت داده‌های دارای توزیع طبیعی (داده‌های پارامتریک) از آزمون Sample t مستقل و جهت داده‌های دارای توزیع غیر طبیعی (داده‌های غیر پارامتریک) از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. همچنین برای مشخص نمودن ارتباط (Correlation) بین شاخص‌های ثبت شده در هر گروه، از آزمون‌های Pearson (برای داده‌های پارامتریک) و Spearman (برای داده‌های غیر پارامتریک) استفاده شد. در تمامی آنالیزهای آماری $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در ابتدا توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov به بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌های مطالعه به صورت کلی و در هر گروه به طور جداگانه اقدام شد (جداول ۱ و ۲).

داده‌ها تنها در ارتباط با زمان بارداری به صورت طبیعی توزیع نشده بودند و بقیه‌ی شاخص‌های ثبت شده، دارای توزیع طبیعی بودند و تنها در خصوص زمان بارداری $P = ۰/۰۰۱$ بود. با بررسی شیوع نوزادان نارس و با وزن کم به طور کلی و جداگانه در گروه‌های مورد مطالعه مشخص شد که از تعداد ۶۰ بیمار، تنها ۲ بیمار و یا ۳/۳ درصد از زایمان‌ها به صورت نارس و ۷ بیمار و یا ۱۱/۷ درصد از زایمان‌ها با وزن کم صورت پذیرفته است. با بررسی شیوع در گروه‌های مورد مطالعه، مشخص گردید که تمامی زایمان‌های نارس و با وزن کم در گروه شاهد صورت گرفته و در گروه مورد، هیچ نوزاد نارس و با وزن کم

به دنیا نیامده است. میزان اختلاف بین دو گروه در ارتباط با وزن نوزادان معنی‌دار بود (P = ۰/۰۰۶) و در ارتباط با مدت بارداری معنی‌دار نبود (P = ۰/۹۵۸).

با انجام آزمون‌های Pearson و Spearman، همبستگی بین داده‌های پارامتریک و غیر پارامتریک بررسی شد و مشخص گردید که بین مدت بارداری با هیچ کدام از پارامترهای اندازه‌گیری شده به طور کلی و در گروه‌های مورد مطالعه به طور جداگانه، هیچ گونه همبستگی وجود ندارد (جدول ۳)؛ در حالی که با بررسی همبستگی وزن نوزادان با شاخص‌های اندازه‌گیری شده، مشخص گردید که بین وزن نوزادان مورد مطالعه با عمق پاکت جلسه‌ی دوم (PD۲) همبستگی منفی و ضعیف وجود دارد. (r = −۰/۲۵۴) (جدول ۴).

همچنین وزن نوزادان با بهبود شاخص‌های مورد مطالعه، یک ارتباط مثبت و ضعیف داشت و این مقدار به ترتیب برای بهبود عمق پاکت، بهبود چسبندگی بافت‌های پریودنتال و بهبود شاخص خونریزی از لثه ۰/۳۶۶، ۰/۳۷۷ و ۰/۴۳۳ بود (جدول ۵).

جدول ۱. بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها در هر گروه

گروه / متغیر	گروه شاهد		گروه مورد	
	میانگین ± انحراف معیار	مقدار P	میانگین ± انحراف معیار	مقدار P
PD۱	۲/۸۳ ± ۰/۴۷	۰/۳۹۸	۲/۵۹ ± ۰/۳۶	۰/۹۸۰
PD۲	۲/۸۵ ± ۰/۴۷	۰/۳۴۰	۲/۵۱ ± ۰/۲۹	۰/۹۹۰
BOP۱	۵۶/۴۵ ± ۹/۱۱	۰/۶۲۴	۵۹/۷۴ ± ۸/۷۱	۰/۳۷۰
BOP۲	۵۸/۳۰ ± ۸/۷۴	۰/۶۰۶	۴۷/۰۸ ± ۴/۸۳	۰/۰۰۷
LOA۱	۱/۰۰ ± ۰/۴۰	۰/۵۰۰	۱/۳۰ ± ۰/۴۳	۰/۷۳۰
LOA۲	۱/۰۱ ± ۰/۴۱	۰/۵۰۲	۱/۲۳ ± ۰/۳۹	۰/۶۶۰
وزن (کیلوگرم)	۲/۸۰ ± ۰/۵۴	۰/۶۲۷	۳/۱۴ ± ۰/۳۶	۰/۵۹۰
مدت بارداری (روز)	۲۷۳/۰۰ ± ۱۶/۰۴	< ۰/۰۰۱	۲۶۷/۹۶ ± ۲/۴۷	۰/۳۳۰

PD: Probing depth; BOP: Bleeding on probing; LOA: Loss of attachment

جدول ۲. شاخص‌های اندازه‌گیری شده در هر گروه

گروه / متغیر	گروه شاهد				گروه مورد			
	میانگین ± انحراف معیار	میانه	کمینه	بیشینه	میانگین ± انحراف معیار	میانه	کمینه	بیشینه
PD۱	۲/۸۳ ± ۰/۴۷	۲/۶۶	۲/۰۶	۳/۸۳	۲/۵۹ ± ۰/۳۶	۰/۹۸۰	۱/۷۹	۳/۶۰
PD۲	۲/۸۵ ± ۰/۴۷	۲/۶۸	۲/۰۸	۳/۸۵	۲/۵۱ ± ۰/۲۹	۰/۹۹۰	۱/۷۸	۳/۱۸
BOP۱	۵۶/۴۵ ± ۹/۱۱	۵۶/۸۲	۳۴/۶۱	۸۲/۰۰	۵۹/۷۴ ± ۸/۷۱	۰/۳۷۰	۳۲/۱۴	۷۰/۵۳
BOP۲	۵۸/۳۰ ± ۸/۷۴	۵۹/۴۱	۳۵/۸۱	۷۹/۰۰	۴۷/۰۸ ± ۴/۸۳	۰/۰۰۷	۲۸/۹۳	۵۰/۷۹
LOA۱	۱/۰۰ ± ۰/۴۰	۱/۰۴	۰/۳۰	۱/۸۸	۱/۳۰ ± ۰/۴۳	۰/۷۳۰	۰/۶۹	۲/۴۰
LOA۲	۱/۰۱ ± ۰/۴۱	۱/۰۴	۰/۳۰	۱/۸۹	۱/۲۳ ± ۰/۳۹	۰/۶۶۰	۰/۶۷	۲/۲۸
وزن (کیلوگرم)	۲/۸۰ ± ۰/۵۴	۲/۹۲	۱/۴۰	۴/۰۰	۳/۱۴ ± ۰/۳۶	۰/۵۹۰	۲/۵۰	۴/۰۰
مدت بارداری (روز)	۲۷۳/۰۰ ± ۱۶/۰۴	۲۷۷/۵۰	۲۱۳/۰۰	۲۸۱/۰۰	۲۶۷/۹۶ ± ۲/۴۷	۰/۳۳۰	۲۷۲/۰۰	۲۸۱/۰۰

PD: Probing depth; BOP: Bleeding on probing; LOA: Loss of attachment

جدول ۳. همبستگی بین مدت بارداری با شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گروه‌های شاهد و مورد

گروه	گروه شاهد		گروه مورد	
	مدت بارداری		مدت بارداری	
متغیر	ضریب همبستگی	مقدار P	ضریب همبستگی	مقدار P
PD۱	۰/۰۵۸	۰/۷۶۳	۰/۳۳۸	۰/۰۶۸
PD۲	۰/۰۴۹	۰/۷۹۸	۰/۳۴۰	۰/۰۶۶
BOP۱	-۰/۰۲۵	۰/۸۹۴	۰/۰۱۱	۰/۹۵۲
BOP۲	۰/۰۴۱	۰/۸۳۰	۰/۱۵۷	۰/۴۰۸
LOA۱	۰/۱۰۶	۰/۵۷۶	۰/۱۱۹	۰/۵۳۲
LOA۲	-۰/۱۰۴	۰/۵۸۴	۰/۱۱۳	۰/۵۵۲
وزن	۰/۵۶۸	۰/۰۰۱	-۰/۰۹۳	۰/۶۲۴

PD: Probing depth; BOP: Bleeding on probing; LOA: Loss of attachment

جدول ۴. همبستگی بین وزن نوزادان با شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گروه‌های شاهد و مورد

گروه	گروه شاهد		گروه مورد	
	وزن		وزن	
متغیر	ضریب همبستگی	مقدار P	ضریب همبستگی	مقدار P
PD۱	-۰/۱۷۵	-۰/۰۶۸	۰/۳۳۸	۰/۷۲۲
PD۲	-۰/۱۶۷	-۰/۰۵۴	۰/۳۴۰	۰/۷۷۶
BOP۱	۰/۰۷۱	۰/۲۶۱	۰/۰۱۱	۰/۱۶۳
LOA۱	-۰/۲۹۳	-۰/۰۰۸	۰/۱۵۷	۰/۹۶۵
LOA۲	-۰/۲۹۲	-۰/۰۰۸	۰/۱۱۹	۰/۹۶۷

PD: Probing depth; BOP: Bleeding on probing; LOA: Loss of attachment

جدول ۵. همبستگی بین وزن نوزادان و مدت بارداری با تغییرات شاخص‌های پریودنتال به صورت کلی

گروه	آزمون Spearman			
	مدت بارداری		وزن	
متغیر	ضریب همبستگی	مقدار P	ضریب همبستگی	مقدار P
DIFF PD	*-۰/۰۵۹	۰/۶۵۶	**۰/۳۶۶	۰/۰۰۴
DIFF BOP	*-۰/۰۷۴	۰/۵۷۶	**۰/۴۳۳	۰/۰۰۱
DIFF LOA	*۰/۰۳۰	۰/۸۲۱	**۰/۳۷۷	۰/۰۰۳

* ضرایب در سطح اطمینان ۰/۰۵ می‌باشد؛ ** ضرایب در سطح اطمینان ۰/۰۱ می‌باشد.

PD: Probing depth; BOP: Bleeding on probing; LOA: Loss of attachment

بحث

مطالعات سادات‌منصوری و همکاران (۸)، Gazolla و همکاران (۹)، Lopez و همکاران (۱۰) و Radnai و همکاران (۱۱) همگی مطالعات کارآزمایی بالینی و از نوع مداخله‌ای بودند که همانند مطالعه‌ی حاضر اختلاف وزن نوزادان در گروه‌های مورد و شاهد را معنی‌دار گزارش نمودند (۱۱-۸). اما Tarannum و Faizuddin (۱۲) علاوه بر وزن نوزادان، اختلاف مدت بارداری را نیز بین دو گروه معنی‌دار گزارش نمودند (P =۰/۰۰۶). Michalowicz و همکاران هیچ

گونه اختلافی را بین گروه‌های مورد مطالعه نه در خصوص وزن نوزادان و نه در خصوص مدت بارداری مشاهده نکردند (۱۳).

بیماران مورد در مطالعه‌ی سادات‌منصوری و همکاران (۸) همگی مبتلا به Moderate to severe پریودنتیت بودند؛ در حالی که تمام بیماران مورد مطالعه‌ی حاضر مبتلا به Mild to moderate پریودنیت بودند. با توجه به اختلاف شدت بیماری بین دو مطالعه، انتظار می‌رفت شیوع نوزادان نارس و با وزن کم در دو مطالعه نیز اختلاف واضحی داشته باشند؛ حال آن که شیوع PLBW (Preterm/low birth weight) در مطالعه‌ی سادات‌منصوری و همکاران (۸) ۲۶/۷ درصد و در مطالعه‌ی حاضر ۲۳/۳ درصد در گروه شاهد بود. از دلایل این اختلاف می‌توان به اختلاف واضح بین خونریزی حین پروب کردن بیماران مطالعه‌ی سادات‌منصوری و همکاران (۸) (۱۳/۴ درصد = BOP۱) با مطالعه‌ی حاضر (۵۶/۴۵ درصد = BOP۱) استناد نمود که نشان دهنده‌ی التهاب بیشتر لثه در بیماران مطالعه‌ی حاضر است.

Gazolla و همکاران با مطالعه‌ی ۳۲۸ بیمار مبتلا به پریودنتیت، شیوع ۷/۵ درصد نوزادان نارس و با وزن کم را در گروه مورد گزارش نمودند؛ حال آن که شیوع نوزادان نارس و با وزن کم در مطالعه‌ی حاضر ۰ درصد بود (۹). از دلایل احتمالی اختلاف مشاهده شده، می‌توان به نوع بیماری پریودنتال در مطالعه‌ی Gazolla و همکاران اشاره نمود؛ چرا که از بین ۲۶۶ بیمار گروه شاهد در ۱۹۲ بیمار، میزان AL = ۳–۵ mm، ۷۰ بیمار AL = ۵–۷ mm و ۴ بیمار AL > ۷ mm بود. در حالی که حداکثر میزان AL مطالعه‌ی حاضر، ۲/۴ بود که از حداقل میزان AL مطالعه‌ی Gazolla و همکاران (۹) نیز کمتر بود.

Lopez و همکاران شیوع ۲/۴ درصد نوزادان نارس و با وزن کم را در گروه مورد ۲/۴ درصد گزارش نمودند؛ در حالی که این میزان در مطالعه‌ی حاضر ۰ درصد بود. با وجود حجم نمونه‌ی بالا در مطالعه‌ی Lopez و همکاران و در گروه شاهد (۲۹۰ نفر)، شیوع نوزادان نارس و با وزن کم در مطالعه‌ی آن‌ها با مطالعه‌ی حاضر به طور تقریبی یکسان بود (هر دو مطالعه ۶/۷ درصد). از دلایل اختلاف شیوع نوزادان نارس و با وزن کم در گروه‌های درمان، می‌توان به اختلاف حجم نمونه‌ی مطالعه‌ی Lopez و همکاران با مطالعه‌ی حاضر (۵۸۰ نفر در مقابل ۳۰ نفر) اشاره نمود (۱۰).

Michalowicz و همکاران با وجود حجم نمونه‌ی بالا (۸۲۳ نفر) هیچ گونه اختلافی را بین گروه‌های مورد (۴۱۳ نفر) و شاهد (۴۱۰ نفر) در خصوص شیوع نوزادان نارس و با وزن کم (به ترتیب ۱۲/۰ درصد در مقابل ۱۲/۸ درصد) گزارش نکردند (۱۳).

از دلایل احتمالی این موضوع می‌توان به اشکال در نمونه‌گیری مطالعه‌ی آن‌ها اشاره نمود؛ چرا که در گروه مورد از میان افراد مورد مطالعه ۱۲/۵ درصد سابقه‌ی PLBW و ۳۵/۵ درصد سابقه‌ی سقط جنین تصادفی و نیز ۱۷ درصد سابقه‌ی سقط جنین انتخابی داشتند. این درصدها در گروه شاهد و برای موارد ذکر شده به ترتیب ۱۶/۵، ۳۰/۸ و ۲۲/۰ درصد بود.

در مطالعه‌ی حاضر بین وزن نوزادان تنها با PD۲ یک همبستگی منفی و ضعیف ملاحظه شد؛ به این معنی که هر قدر مقدار عمق پاکت جلسه‌ی دوم کمتر باشد، باعث به دنیا آمدن نوزادان با وزن بیشتر خواهد

شد. در ضمن، وزن با بهبود شاخص‌های پریودنتال نیز یک ارتباط مثبت داشت. این مقدار در خصوص بهبود BOP از دو شاخص دیگر (PD و AL) بیشتر بود (به ترتیب ۰/۴۳۲، ۰/۳۶۶ و ۰/۳۷۷). به عبارت دیگر، هر قدر درمان‌های پریودنتال صورت پذیرفته موفق‌تر باشد و به خصوص باعث کاهش میزان BOP شود، می‌تواند باعث به دنیا آوردن نوزادان با وزن بیشتر شود.

Santos-Pereira و همکاران (۱۴) و نیز Sanchez و همکاران (۱۵) به ارتباط و همبستگی مثبت بین وزن نوزادان مورد مطالعه با شاخص‌های پریودنتال اشاره نمودند که یافته‌های ایشان همانند یافته‌های مطالعه‌ی حاضر بود. ضمن این که Gomes-filho و همکاران هیچ گونه ارتباطی بین وزن نوزادان با شاخص‌های پریودنتال ثبت شده به دست نیاوردند (۱۶).

از مطالعه‌ی حاضر چنین بر می‌آید که درمان پریودنتال باعث کاهش معنی‌دار فراوانی نوزادان نارس و با وزن کم خواهد شد. همچنین میزان وزن نوزادان با شاخص عمق پاکت لثه‌ای در جلسه‌ی دوم ارتباط دارد؛ یعنی هر قدر عمق پاکت در انتهای درمان کمتر باشد، این امر باعث افزایش وزن نوزاد خواهد شد و هر قدر درمان پریودنتال مؤثرتر و مناسب‌تر انجام پذیرد، احتمال ایجاد مشکلات زمان زایمان کمتر خواهد بود. بنابراین هماهنگی بین متخصصین زنان و زایمان با دندانپزشکان جهت دادن آگاهی‌های لازم به زنان باردار، توجه به نقش تغذیه و مراقبت‌های بهداشتی در بازسازی انساج از دست رفته‌ی پریودنشیم در زنان باردار و لزوم درمان سریع بیماری‌های پریودنتال در زنان باردار، باعث جلوگیری از نقش بیماری پریودنتال در تولد نوزادان نارس و کم وزن و عوارض جبران ناپذیر آن می‌گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین که منابع مالی اجرای این پژوهش را تأمین نمودند.

References

1. McGaw T. Periodontal disease and preterm delivery of low-birth-weight infants. J Can Dent Assoc 2002; 68(3): 165-9.
2. Moreu G, Tellez L, Gonzalez-Jaranay M. Relationship between maternal periodontal disease and low-birth-weight pre-term infants. J Clin Periodontol 2005; 32(6): 622-7.
3. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza'S clinical periodontology. 10th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2006.
4. Karimi M, Rafeeian S. Evaluation of relation between periodontal diseases and preterm delivery of low-birth-weight infants at Kossar Hospital In Qazvin [Thesis]. Qazvin, Iran: Qazvin University of Medical Sciences; 2000.
5. Marcdante K, Kliegman RM, Behrman RE. Nelson essentials of pediatrics.5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2006.p. 388.
6. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap II LC, Wenstrom K. Williams obstetrics.22th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2005. p. 128, 533, 535.
7. Scannapieco FA. Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. J Periodontol 1998; 69(7): 841-50.
8. Sadatmansouri S, Sedighpoor N, Aghaloo M. Effects of periodontal treatment phase I on birth term and birth weight. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2006; 24(1): 23-6.
9. Gazolla CM, Ribeiro A, Moyses MR, Oliveira LA, Pereira LJ, Sallum AW. Evaluation of the incidence of preterm low birth weight in patients undergoing periodontal therapy. J Periodontol 2007; 78(5): 842-8.
10. Lopez NJ, Da S, I, Ipinza J, Gutierrez J.

Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. J Periodontol 2005; 76(11 Suppl): 2144-53.
11. Radnai M, Pal A, Novak T, Urban E, Eller J, Heffter N, et al. The possible effect of basic periodontal treatment on the outcome of pregnancy. Fogorv Sz 2008; 101(5): 179-85.
12. Tarannum F, Faizuddin M. Effect of periodontal therapy on pregnancy outcome in women affected by periodontitis. J Periodontol 2007; 78(11): 2095-103.
13. Michalowicz BS, Hodges JS, DiAngelis AJ, Lupo VR, Novak MJ, Ferguson JE, et al. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. N Engl J Med 2006; 355(18): 1885-94.
14. Santos-Pereira SA, Giraldo PC, Saba-Chujfi E, Amaral RL, Morais SS, Fachini AM, et al. Chronic periodontitis and pre-term labour in Brazilian pregnant women: an association to be analysed. J Clin Periodontol 2007; 34(3): 208-13.
15. Sanchez AR, Bagniewski S, Weaver AL, Vallejos N. Correlations between maternal periodontal conditions and preterm low birth weight infants. J Int Acad Periodontol 2007; 9(2): 34-41.
16. Gomes-Filho IS, da Cruz SS, Rezende EJ, da Silveira BB, Trindade SC, Passos JS, et al. Periodontal status as predictor of prematurity and low birth weight. J Public Health Dent 2006; 66(4): 295-8.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 18.11.2013
Vol. 32, No. 272, 1st Week, April 2014
Accepted: 08.02.2014

The Effects of Periodontal Treatment on Incidence of Preterm Low Birth Weight among Pregnant Women with Mild to Moderate Periodontitis

Mohammad Reza Naseh MD[1], Azin Vahid DDS[2], Nazanin Zangeneh DDS[3], Fatemeh Lalooha MD[4], Marzyeh Rezaee MD[5], Navid Mohammadi PhD[6], Farahnaz Rezaee[7]

Original Article

Abstract

Background: Most of the studies support the statement that maternal periodontitis may be a risk factor for infants with preterm delivery and low-birth-weight (PLBW). The aim of the present research was to determine the effects of periodontal treatment on incidence of PLBW among women with mild to moderate periodontitis.

Methods: 60 pregnant women received dental and periodontal examination [probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), and bleeding on probing (BOP)]. 30 of these pregnant women (the treatment group) received professional oral hygiene treatment including plaque and calculus removal and root planning at the beginning and end of 8th month of pregnancy. The control group just received the periodontal examination. The mean length of pregnancy and birth-weight were compared between the groups. Statistical analysis was determined using Kolmogorov-Smirnov, independent-sample t, Mann-Whitney U, Pearson and Spearman tests.

Findings: The incidence of PLBW in treatment group was significantly lower than the control group (P = 0.006). No correlation was found between clinical parameters and the time of pregnancy or infant's weight. There was a weak positive correlation between the infant's weight and the improvement of clinical parameters.

Conclusion: The results support the hypothesis that maternal periodontal disease is associated with infant prematurity and low birth weight. Therefore, the periodontal treatment can contribute to optimal date of delivery and achieving greater birth-weight.

Keywords: Periodontal disease, Low birth weight, Pregnancy, Preterm delivery and low-birth-weight (PLBW)

Citation: Naseh MR, Vahid A, Zangeneh N, Lalooha F, Rezaee M, Mohammadi N, et al. **The Effects of Periodontal Treatment on Incidence of Preterm Low Birth Weight among Pregnant Women with Mild to Moderate Periodontitis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(272): 16-24

1- Assistant Professor, Department of Periodontology, School of Dentistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
2- Dentist, Qazvin, Iran
3- Resident, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Islamic Azad University, Tehran Branch, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
5- Obstetrician and Gynecologist, Isfahan, Iran
6- Associate Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7- Isfahan Health Center No. 2, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Nazanin Zangeneh DDS, Email: den_zangeneh@yahoo.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۲/هفته اول فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۲

بررسی ارتباط پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu با خونریزی سیستم اعصاب مرکزی در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳

دکتر مجید نادری[۱]، اکبر درگلاله[۲]، دکتر شعبان علیزاده[۳]، دکتر احمد کاظمی[۴]، شادی طبیبیان[۲]، دکتر حسین درگاهی[۵]، زهرا کاشانی خطیب[۶]، میثم کشیری[۲]، مریم سادات حسینی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کمبود فاکتور ۱۳ یک اختلال خونریزی دهنده‌ی نادر است که بالاترین شیوع جهانی آن مربوط به استان سیستان و بلوچستان می‌باشد. این اختلال با تظاهرات بالینی مختلف از جمله خونریزی در سیستم اعصاب مرکزی همراه است. Pro۵۶۴Leu یکی از جهش‌های شایع در فاکتور ۱۳ می‌باشد. هدف مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی نقش پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu ژن کد کننده‌ی زیرواحد A فاکتور ۱۳، در خونریزی سیستم عصبی مرکزی (خونریزی داخل یا خارج مغزی) در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ بود.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر از نوع مورد- شاهد بود که بر روی ۳۲ بیمار مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ با سابقه‌ی خونریزی داخل جمجمه‌ای (گروه مورد) و همچنین ۳۲ بیمار مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ اما بدون هیچ گونه تاریخچه‌ای از خونریزی داخل جمجمه‌ای (گروه شاهد) انجام شد. در ابتدا، هر دو گروه به منظور تأیید اختلالشان از نظر پلی مورفیسم فاکتور ۱۳، Trp۱۳Arg مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس تمامی بیماران از نظر پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu ژن فاکتور ۱۳ بررسی شدند و در نهایت، داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند.

یافته‌ها: تمامی بیماران تحت مطالعه برای پلی مورفیسم Trp۱۳Arg هموزیگوت بودند و هیچ یک از بیماران جهش Pro۵۶۴Leu نداشتند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu، اثری در بروز خونریزی داخل یا خارج جمجمه‌ای در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ ندارد.

واژگان کلیدی: کمبود فاکتور ۱۳، خونریزی CNS، خونریزی داخل جمجمه‌ای، خونریزی خارج جمجمه‌ای

ارجاع: نادری مجید، درگلاله اکبر، علیزاده شعبان، کاظمی احمد، طبیبیان شادی، درگاهی حسین، کاشانی خطیب زهرا، کشیری میثم، حسینی مریم سادات. **بررسی ارتباط پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu با خونریزی سیستم اعصاب مرکزی در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۲): ۳۳-۲۵

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک در بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استاد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۵- دانشیار، گروه مدیریت خدمات بهداشتی- درمانی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شعبان علیزاده
Email: alizadehs@sina.tums.ac.ir

مقدمه

کمبود فاکتور ۱۳ اختلالی خونریزی دهنده با توارث اتوزوم مغلوب و با شیوع ۱ در ۳ــ۱ میلیون نفر می‌باشد (۲-۱). کمبود شدید فاکتور ۱۳ به عنوان یک اختلال خونریزی دهنده‌ی نادر (RBD یا Rare bleeding disorder) اغلب در مناطق وفور ازدواج فامیلی مشاهده می‌شود. بر اساس اطلاعات موجود، استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرق ایران بیشترین شیوع کمبود فاکتور ۱۳ در جهان را دارا می‌باشد (۱). این اختلال طیف گسترده‌ای از علایم بالینی از خونریزی خفیف تا عوارض تهدید کننده‌ی زندگی از جمله خونریزی (Central nervous system) CNS را بروز می‌دهد (۳، ۱).

خونریزی داخل جمجمه‌ای، یک تظاهر بالینی شایع اما تهدید کننده‌ی حیات در بیماران مبتلا به کمبود شدید فاکتور ۱۳ است که به عنوان علت اصلی مرگ و میر در این بیماران شناخته می‌شود (۵-۴). در میان اختلالات خونریزی دهنده‌ی نادر شامل کمبود فاکتورهای X، XIII، V، V + VIII، VII و نیز کمبود فاکتور ۱۳، خونریزی CNS در بیماران مبتلا به کمبود فاکتورهای FVII، V۱۳ و FX دارای شیوع بیشتری می‌باشد (۷-۶).

جهش در زیرواحد A فاکتور ۱۳، علت اصلی کمبود مادرزادی فاکتور ۱۳ است و اغلب در هر ۳-۱ میلیون نفر مشاهده می‌شود. این در حالی است که زیرواحد B فاکتور ۱۳ علت نادر بیماری محسوب می‌شود. اگر چه، جهش‌های مختلفی در هر یک از این زیرواحدها گزارش شده است؛ اما جهش Missense در زیرواحد A در برگیرنده‌ی ۵۰ درصد کل جهش‌های فاکتور ۱۳ می‌باشد (۸، ۳).

در حال حاضر، تعداد قابل توجهی از جهش‌های فاکتور ۱۳ شناخته شده است؛ به طوری که شایع‌ترین جهش‌های زیرواحد A فاکتور ۱۳ شامل Val۳۴Leu در اگزون ۲، Tyr۲۰۴Phe در اگزون ۵، Pro(CCC)۳۳۱(CCA)Pro در اگزون ۸، Glu(GAA)۵۶۷Glu(GAG)، Pro۵۶۴Leu در اگزون ۱۲، Glu۶۵۱Gln و Val۶۵۰Ile در اگزون ۱۴ می‌باشد. در زیرواحد B دو پلی مورفیسم شایع گزارش شده است که شامل His۹۵Arg و تغییر C۲۹۷۵۹G می‌باشد (۸-۷، ۳).

مطالعات بر روی اثرات ساختاری و عملکردی این جهش‌ها منجر به فهم بهتر دلایل و تشخیص دقیق این اختلال می‌گردد. بر این اساس، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی نقش پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu در خونریزی مغزی در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ در جنوب شرق ایران انجام شد.

روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه و گروه شاهد

مطالعه‌ی حاضر بر روی ۳۲ بیمار مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ و دارای سابقه‌ی خونریزی سیستم اعصاب مرکزی به عنوان گروه مورد و نیز ۳۲ بیمار مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ و بدون هیچ گونه سابقه‌ی خونریزی مغزی به عنوان گروه شاهد انجام شد.

تمام بیماران از مرکز هموفیلی شهر زاهدان انتخاب شدند و پس از توجیه طرح از تمام بیماران یا والدین آن‌ها رضایت‌نامه‌ی کتبی کسب شد. همچنین مطالعه به تصویب کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران رسید.

بیماران با آزمایش حلالیت لخته در اوره‌ی ۵

مولار یا منوکلرواستیک اسید ۱ درصد غیر طبیعی، سابقه‌ی خونریزی داخل یا خارج جمجمه‌ای که توسط اسکن توموگرافی کامپیوتری (CT scan یا Computed tomography scan) (Toshiba Aquilion:Toshiba medical systems, Japan) تأیید شده بودند و یا پاسخ مناسب به درمان با فرآورده‌ی درمانی، وارد مطالعه شدند. در ادامه، بیماران با کمبود همزمان فاکتور ۱۳ و سایر فاکتورهای انعقادی، سابقه‌ی خونریزی مغزی به وسیله‌ی سایر عوامل، بیماری کبدی و تومورهای مغزی از مطالعه خارج شدند.

بیماران تحت مطالعه، کمبود شدید فاکتور ۱۳ داشتند که توسط آزمایش‌های اوره‌ی ۵ مولار و منوکلرو استیک ۱ درصد شناسایی شدند که این آزمایش‌ها نشان دهنده‌ی سطح پلاسمایی ۱۳ به ترتیب ۱ درصد > و ۱۰ درصد > می‌باشد. در ابتدا، یک پرسش‌نامه راجع به ویژگی‌های دموگرافی، شامل سن، جنس، وزن و سابقه‌ی خونریزی از CNS و همچنین مدت زمان، مقدار و نوع درمان برای هر بیمار، توسط یک پرسنل آموزش دیده تکمیل شد.

استخراج DNA

به منظور جداسازی DNA، ۲ میلی‌لیتر نمونه‌ی خون از بیماران تحت مطالعه در لوله‌ی حاوی ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) جمع‌آوری شد. DNA ژنومی از گلبول‌های سفید نمونه‌ها توسط کیت (Viogene, USA) استخراج و در مرحله‌ی بعد به منظور تعیین کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر و نیز توسط الکتروفورز بررسی شدند.

مطالعات DNA

پلی مورفیسم فاکتور ۱۳ (Trp۱۸۷Arg)

در ابتدا تمام بیماران مورد مطالعه از نظر جهش Trp۱۸۷Arg (C.۵۵۹T > C) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت ارزیابی این پلی مورفیسم، DNA ژنومی توسط واکنش (Polymerase chain reaction) PCR به صورت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه برای اتصال پرایمر به تک رشته ی DNA، سپس ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه و در نهایت، ۵ دقیقه در ۷۲ درجه تکثیر یافت. تعداد ۳۰ سیکل برای واکنش فوق در نظر گرفته شد. DNA تکثیر یافته، در مرحله‌ی بعد به کمک تکنیک RFLP (Restriction fragment length polymorphism) و توسط آنزیم Eco۱۳۰I (Fermentas life sciences, York, UK) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در افراد فاقد موتاسیون، پس از اثر آنزیم، محصول PCR اولیه به سه بخش ۳۹۲، ۶۸ و ۵۳ جفت بازی، در افراد هتروزیگوت به قطعات ۴۶۰، ۳۹۲، ۶۸ و ۵۳ جفت بازی و در افراد هموزیگوت برای موتاسیون قطعات ۴۶۰ و ۵۳ جفت بازی ایجاد می‌شود (جدول ۱).

پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu

پس از تأیید کمبود فاکتور ۱۳ به وسیله‌ی بررسی ملکولی، تمامی بیماران از نظر وجود موتاسیون Pro۵۶۴Leu مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا DNA ژنومی توسط واکنش PCR به صورت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه برای اتصال پرایمر به تک رشته‌ی DNA، سپس ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه تکثیر یافت. تعداد دفعات واکنش فوق ۳۰

جدول ۱. شرایط **Polymerase chain reaction** (**PCR**) و پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

مرجع	آنزیم محدود کننده	محصول PCR (جفت باز)	پلی مورفیسم	پرایمر
۹	Eco۱۳۰I	bp ۵۱۳	F۱۳ Trp۱۸۷Arg	۵-Forward: ۳TTGCAGACTTGCCTGATTTG- ۵-Reverse: ۳CAAGCGATCCTCCCATCTTG-
۹	Bst UI	bp ۱۱۶	Pro۵۶۴Leu	۵-Forward: ۳TCACCTTCTACACCGGGGTCG- ۵-Reverse: ۳GACAGCGAGTCTCACAAAGAA-

سیکل در نظر گرفته شد. DNA تکثیر داده شد و در ادامه، محصول PCR که یک قطعه‌ی ۱۱۶ جفت بازی بود، تحت تأثیر آنزیمی با اثر محدود (Bst UI) قرار گرفت تا از نظر وجود موتاسیون فوق، مورد ارزیابی قرار گیرد (جدول ۱).

پس از اثر این آنزیم در افراد فاقد موتاسیون، دو قطعه‌ی ۹۵ و ۲۱ جفت بازی ایجاد شد. در افراد دارای موتاسیون به صورت هتروزیگوت، علاوه بر دو قطعه‌ی فوق، قطعه‌ی اولیه‌ی ۱۱۶ جفت بازی نیز مشاهده می‌شود و در افراد هموزیگوت، برای موتاسیون تنها قطعه‌ی ۱۱۶ جفت بازی اولیه بدون هر گونه برشی مشاهده شد.

آنالیز آماری

نتایج برای متغیرهای کمی به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) گزارش شد. نتایج کمتر از ۰/۰۵۰ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. از آزمون آماری t مستقل نیز برای مقایسه‌ی گروه‌های مورد و شاهد استفاده شد. ارتباط بین پلی مورفیسم ژن Pro۵۶۴Leu و خونریزی مغزی با استفاده از رگرسیون لجستیک محاسبه شد و به صورت نسبت شانس (OR یا Odds ratio) با سطح اطمینان ۹۵ درصد بیان شد.

یافته‌ها

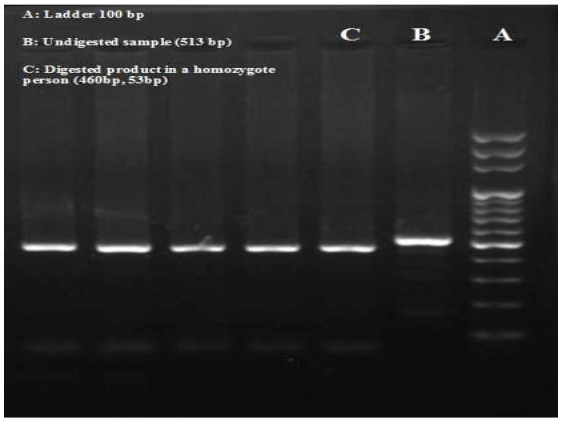
ویژگی‌های افراد مورد مطالعه

تمامی بیماران مورد مطالعه دارای آزمایش حلالیت لخته‌ی غیر طبیعی در محیط اوره‌ی ۵ مولار و یا اسید منوکلرواستیک ۱ درصد بودند. هر چند که این آزمایش‌ها در کنار تظاهرات بالینی و پاسخ به درمان با پلاسمای تازه منجمد (FFP یا Fresh frozen plasma) و کنسانتره‌ی فاکتور ۱۳ برای تشخیص بیماران کافی به نظر می‌رسیدند؛ اما تمامی بیماران از نظر وجود پلی مورفیسم Trp۱۸۷Arg که از قبل برای بیماران این استان گزارش شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی مولکولی بیماران نشان داد که تمام بیماران تحت مطالعه برای موتاسیون TGG:CGG در کدون ۱۸۷ در اگزون ۴ از ژن زیرواحد A فاکتور ۱۳، هموزیگوت بودند. این موتاسیون منجر به جایگزینی تریپتوفان با آرژنین در جایگاه ۱۸۷ می‌شود. این جایگزینی منجر به ایجاد پیوند استری بین اتم‌های آرژنین و محیط اطراف و در نتیجه، تولید پروتئینی ناپایدار می‌گردد.

شکل ۱ نتایج حاصل از هضم آنزیمی برای پلی مورفیسم Trp۱۸۷Arg را نشان می‌دهد.

بررسی بالینی بیماران نشان داد که خونریزی از بند ناف شایع‌ترین تظاهر بالینی (۸۵ درصد) در تمام افراد مورد مطالعه بود. هماتوم و اکیموز از دیگر تظاهرات بالینی شایع در میان بیماران مورد بررسی بود که به ترتیب در ۷۹ و ۷۵ درصد بیماران مشاهده گردید. خونریزی پس از ختنه، تأخیر در التیام زخم، خونریزی پس از کشیدن دندان و خونریزی از بینی به ترتیب در ۲۲، ۱۵، ۱۳ و ۱۲ درصد بیماران دیده شد.



شکل ۱. نتایج حاصل از هضم آنزیمی برای پلی مورفیسم Trp۱۸۷Arg

A: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی :

B: محصول ۵۱۳ جفت بازی که تحت تأثیر آنزیم قرار نگرفته است

C: نمونه‌ی هموزیگوت که پس از اثر آنزیم به دو قطعه‌ی ۴۶۰ و ۵۳ جفت بازی شکسته است.

خونریزی مغزی

از بین ۳۲ بیمار با خونریزی مغزی، ۷ بیمار (۲/۸ درصد) دچار خونریزی مغزی مکرر پیش از آغاز درمان پیشگیرانه شده بودند. در حالی که سایر بیماران مبتلا به خونریزی مغزی، تنها یک بار دچار خونریزی مغزی شده بودند. به طور تقریبی تمام بیماران (۹۶/۹ درصد) داری پاسخ مناسب به درمان پیشگیرانه بودند و هیچ یک از این بیماران به جز یک نفر دچار خونریزی مغزی نشده بودند.

بررسی آماری مشخص کرد که ارتباط معنی‌داری بین سن تشخیص کمبود فاکتور ۱۳ و وقوع خونریزی مغزی وجود دارد ($P < ۰/۰۰۲$، $r = ۰/۴۹۵$). همچنین ارتباط معنی‌داری بین عود خونریزی مغزی و جنسیت بیماران وجود دارد.

خونریزی داخل پارانشیم مغزی، شایع‌ترین محل خونریزی مغزی بود و در ۲۶ بیمار مشاهده شد (۹۲/۸ درصد). همچنین خونریزی Subdural و Epidural در ۲ بیمار دیده شد (۷/۱ درصد). مناطق آناتومیک خونریزی داخل پارانشیم در بیماران در ناحیه‌ی تمپورال در ۹ بیمار (۳۲/۲ درصد)، در ناحیه‌ی پس سری در ۸ بیمار (۲۸/۶ درصد)، خونریزی منتشر داخل پارانشیم در ۷ بیمار (۲۵ درصد)، Tempro-occipital در ۲ بیمار (۷/۱ درصد) وجود داشت.

پلی‌مورفیسم Pro۵۶۴Leu ژن فاکتور ۱۳

پلی‌مورفیسم ژن Pro۵۶۴Leu یک پلی مورفیسم شایع در بیماران با کمبود فاکتور ۱۳ می‌باشد که به جایگزینی اسید آمینه‌ی پرولین با لوسین در جایگاه ۵۶۴ منجر می‌شود (۹). این پلی مورفیسم با خونریزی‌های مغزی، سقط مکرر و سکته‌ی قلبی ارتباط دارد (۱۰). بررسی‌های مولکولی در این مطالعه نشان داد که هیچ یک از بیماران مورد بررسی در گروه‌های مورد و شاهد برای این پلی مورفیسم، هموزیگوت و حتی هتروزیگوت هم نبودند.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت این پلی مورفیسم در منطقه‌ی سیستان و بلوچستان شایع نیست و با توجه به ارتباط خونریزی مغزی در گروه مورد و شاهد، می‌توان نتیجه گرفت که ارتباطی بین

موتاسیون Pro۵۶۴Leu و خونریزی مغزی وجود ندارد.

بحث

کمبود فاکتور ۱۳ یکی از اختلالات خونریزی دهنده‌ی نادر (RBD یا Rare bleeding disorder) با شیوعی در حدود ۱ نفر به ازای هر ۳-۱ میلیون در جمعیت عمومی می‌باشد. شیوع این اختلال در استان سیستان و بلوچستان بالا است؛ به طوری که بیش از ۳۵۰ بیمار با کمبود شدید فاکتور ۱۳ در مرکز هموفیلی در این استان شناسایی شده‌اند و تحت درمان پیشگیرانه می‌باشند.

در حقیقت، این استان با شیوع ۹۰ نفری به ازای هر یک میلیون نفر از این اختلال، دارای بیشترین شیوع بیماری در سراسر جهان می‌باشد. کمبود شدید فاکتور ۱۳ با طیف گسترده‌ای از تظاهرات بالینی شامل خونریزی پس از ختنه، تأخیر در التیام زخم، خونریزی پس از کشیدن دندان، خونریزی از بینی و خونریزی مغزی همراه می‌باشد (۱۱).

بین پلی مورفیسم‌های Pro۵۶۴Leu و Tyr۲۰۴Phe ژن فاکتور ۱۳ و کاهش مقدار فاکتور ۱۳ در پلاسما ارتباط وجود دارد؛ در نتیجه، بررسی ژنوتایپ فاکتور ۱۳ بر اندازه‌گیری سطح فعالیت فاکتور ۱۳ ارجحیت دارد (۹).

به طور کلی، مزیت مطالعات بر روی واریانت‌های ژنتیکی (از جمله فاکتور ۱۳) در این است که در بدو تولد ثابت هستند؛ اما بررسی سطح فعالیت پلاسمایی فاکتور ۱۳ تحت تأثیر بیماری‌های گوناگون و رخدادهای عروق مغزی تغییر خواهد کرد و سطح فعالیت این فاکتور دچار نوساناتی خواهد شد (۱۱).

خونریزی مغزی مهم‌ترین تظاهر بالینی تهدید کننده‌ی زندگی بیماران مبتلا به کمبود شدید فاکتور ۱۳ می‌باشد. در مرکز مورد مطالعه، حدد ۵۰ بیمار مبتلا به کمبود شدید فاکتور ۱۳، دچار خونریزی مغزی شده‌اند. در استان سیستان و بلوچستان در خانواده‌های مبتلا به کمبود شدید فاکتور ۱۳ و سابقه‌ی مرگ و میر ناشی از خونریزی مغزی، نگرانی بزرگ از تکرار این عارضه‌ی خطرناک وجود دارد. در چنین خانواده‌هایی به علت عدم مراجعه به پزشک و تشخیص به موقع بیماری، برخی از فرزندان آن‌ها به علت خونریزی مغزی ناشی از ضایعات ترومایی یا غیر ترومایی فوت کرده‌اند.

اگر چه این یک ادعا است، اما به نظر می‌رسد که این مرگ و میرهای ناشی از خونریزی مغزی به دلیل کمبود فاکتور ۱۳ در این بیماران بوده است. حضور یک یا چندین کودک مبتلا به خونریزی مغزی ناشی از کمبود فاکتور ۱۳ در این خانواده‌ها دلیلی بر این ادعا است. به دلیل این نگرانی، یک مطالعه‌ی گسترده در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ در این استان آغاز گردید.

در ابتدا نگرانی عمده‌ی پژوهشگران در مورد بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ تشخیص بیماری بود. در تنها مرکز هموفیلی استان در شهرستان زاهدان، تشخیص بیماری بر اساس سابقه‌ی خانوادگی، الگوی تظاهرات بالینی و آزمایش حلالیت لخته‌ی خون در اوره‌ی ۵ مولار یا محیط منوکلرواستیک اسید ۱ درصد صورت می‌گیرد. به علت این نگرانی‌ها، یک مطالعه‌ی مولکولی روی تمام بیماران مورد مطالعه برای تشخیص بیماری انجام شد.

در این پژوهش از نتایجی دو مطالعه‌ی جداگانه

در مورد پلی مورفیسم Arg۱۸۷Trp که توسط Trinh و همکاران (۱۲) و نیز تمدن و همکاران (۹) انجام شده بود، استفاده گردید.

مطالعه‌ی حاضر روی این ۶۴ بیمار، نشان داد که تمامی بیماران برای پلی مورفیسم Arg۱۸۷Trp هموزیگوت بودند. این پلی مورفیسم منجر به ناپایداری زیرواحد A فاکتور ۱۳ و کاهش قابل ملاحظه در سطح پلاسمای فاکتور ۱۳ می‌شود. تعیین این پلی مورفیسم در این گروه بزرگ از بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ یک یافته‌ی حیاتی در تشخیص و مدیریت بیماری در این استان می‌باشد. این پلی‌مورفیسم می‌تواند به سادگی و با قابلیت اطمینان بالا به عنوان یک آزمون تشخیصی برای بیماران مورد استفاده قرار گیرد و به کارگیری این پلی مورفیسم منجر به تشخیص دقیق بیماری و جلوگیری از تشخیص نادرست این اختلال خواهد شد. این اولین مرحله از مدیریت این اختلال در این استان می‌باشد. از آن جایی که این ۶۴ بیمار، تعداد قابل توجهی از بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ را تشکیل می‌دهند، اطلاعات بالینی این بیماران نیز دارای اهمیت ویژه می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در میان این بیماران، خونریزی بند ناف شایع‌ترین تظاهر بالینی بیماران است و ۸۳ درصد از بیماران، این تظاهر بالینی را بروز داده‌اند. در مطالعه‌ی عشقی و همکاران بر روی ۶۴ بیمار مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳، خونریزی از بند ناف شایع‌ترین تظاهر بالینی (۸۳ درصد) معرفی شد و در مطالعه‌ی آن‌ها کبودی آسان (۵۰ درصد) و هماتوم (۴۶ درصد) سایر تظاهرات بالینی شایع معرفی شدند (۱۳).

در مطالعه‌ی حاضر نیز هماتوم به عنوان یک تظاهر بالینی شایع شناخته و در ۷۹ درصد از بیماران مشاهده شد. یکی دیگر از اهداف این مطالعه، ارزیابی تأثیر پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu ژن فاکتور ۱۳ در میزان بروز خونریزی مغزی در میان بیماران بود.

پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu در ناحیه‌ی اگزون ۱۲ ژن کد کننده‌ی زیرواحد A فاکتور ۱۳ با اختلالات متعددی از جمله، سقط جنین، بیماری عروقی کرونر، سکته‌ی قلبی (MI یا Myocardial infarction) و عوارض ترومبوتیک و هموراژیک همراه است (۹). در مطالعه‌ی Reiner و همکاران، ارتباط معنی‌داری بین خونریزی‌های مغزی زنان سفیدپوست و پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu فاکتور ۱۳ مشاهده شد. همچنین افرادی که از نظر پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu هموزیگوت بودند، حدود ۵ برابر و افراد هتروزیگوت حدود ۲ برابر افزایش خطر ابتلا به خونریزی مغزی داشتند (۸). در مطالعه‌ی نادری و همکاران، ارتباط قوی بین پلی مورفیسم Thr۳۲۵Ile ژن Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) و احتمال خونریزی مغزی در بیماران مبتلا به کمبود فاکتور ۱۳ شناسایی شد که احتمال خونریزی مغزی را در این بیماران ۲۰ برابر افزایش می‌دهد (۱۴).

هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی نقش این پلی مورفیسم در وقوع خونریزی مغزی در بیماران مبتلا به کمبود شدید فاکتور ۱۳ بود. مطالعه‌ی حاضر همچنین به بررسی جهت یافتن یک عامل ژنتیکی ثانویه برای پیش‌بینی خطر خونریزی دستگاه عصبی مرکزی در بیماران پرداخت. با استفاده از این فاکتور، پیش‌آگهی تمام بیماران مشکوک به خونریزی مغزی را می‌توان تحت مراقبت‌های شدید پزشکی قرار داد و

از نرخ مرگ و میر و عوارض و هزینه‌های اجتماعی و مالی ناشی از این بیماری در استان کاست.

مطالعه‌ی حاضر هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم Pro۵۶۴Leu زیرواحد A ژن فاکتور ۱۳ و خطر خونریزی مغزی در بیماران مبتلا به کمبود شدید فاکتور ۱۳ نیافت. با این وجود، با توجه به نقش فاکتورهای ژنتیکی در بروز اختلالات ترومبوتیک مغزی، بررسی جهت فاکتورهای ژنتیکی دیگر ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل طرح مصوب شماره‌ی ۹۱-۴-۳۱-۱۹۲۱۳ بوده، نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل حمایت مالی از این پروژه قدردانی نمایند.

References

1. Karimi M, Bereczky Z, Cohan N, Muszbek L. Factor XIII deficiency. Semin Thromb Hemost 2009 Jun;35(4): 426–38.
2. Hsieh L, Nugent D. Factor XIII deficiency. Haemophilia 2008; 14(6): 1190-200.
3. Naderi M, Dorgalaleh A, Tabibian S, Alizadeh S, Eshghi P, Solaimani G. Current understanding in diagnosis and management of factor XIII deficiency. Iran J Ped Hematol Oncol 2013; 3(4): 164-72.
4. Siboni SM, Zanon E, Sottilotta G, Consonni D, Castaman G, Mikovic D, et al. Central nervous system bleeding in patients with rare bleeding disorders. Haemophilia 2012; 18(1): 34-8.
5. Naderi M, Eshghi P, Saneei ME, Alizadeh S, Dorgalaleh A, Younesi MR, et al. Safety of human blood products in rare bleeding disorders in southeast of Iran. Haemophilia 2013; 19(2): e90-e92.
6. Agren A, Wiman B, Stiller V, Lindmarker P, Sten-Linder M, Carlsson A, et al. Evaluation of low PAI-1 activity as a risk factor for hemorrhagic diathesis. J Thromb Haemost 2006; 4(1): 201-8.
7. Biswas A, Ivaskevicius V, Seitz R, Thomas A, Oldenburg J. An update of the mutation profile of Factor 13 A and B genes. Blood Rev 2011; 25(5): 193-204.
8. Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, Longstreth WT, Jr., Hindorff LA, Teramura G, et al. Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. Stroke 2001; 32(11): 2580-6.
9. Tamadon GH, Kazemi A, Rastegar G, Alla F, Hejazi S. Molecular basis of inherited factor XIII-A deficiency among patients from sistan-baluchestan. Zahedan J Res Med Sci 2010; 11(4): 11-5.
10. Naderi M, Dorgalaleh A, Alizadeh Sh, Kazemi A, Tabibian S, Younesi MR. Assessment of relationship between CNS bleeding in factor XIII deficiency and Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor polymorphism. J Arak Univ Med Sci 2013; 16(7). [In Persian].
11. Naderi M, Eshghi P, Dorgalaleh A, Tabibian S, editors. Clinical manifestations of rare bleeding disorders in South East of Iran. Haemophilia 2013; 19(2): PO 382.
12. Trinh CH, Sh EW, Eshghi P, Miri-Moghaddam E, Zadeh-Vakili A, Markham AF, et al. Molecular analysis of sixteen unrelated factor XIIIA deficient families from south-east of Iran. Br J Haematol 2008; 140(5): 581-4.
13. Eshghi P, Abolghasemi H, Sanei-Moghaddam E, Anwar R, Jazebi M, Amid A, Et al. Factor XIII deficiency in south-east Iran. Haemophilia. 2004;10(5):470-2.
14. Naderi M, Imani M, Eshghi P, Dorgalaleh A, Tabibian S, Alizadeh S, et al . Factor XIII deficiency in Sistan and Baluchistan province. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 10 (3): 282-8.

Journal of Isfahan Medical School Received: 25.11.2013

Vol. 32, No. 272, 1st Week, April 2014 Accepted: 11.02.2014

Role of Pro564Leu of FXIII-A Gene Polymorphism and Risk of Central Nervous Bleeding in Patients with Congenital Factor XIII Deficiency, Southeast of Iran

Majid Naderi MD[1], Akbar Dorgalaleh MSC[2], Shaban Alizadeh PhD[3], Ahmad Kazemi PhD[4], Shadi Tabibian MSC[2], Hossein Dargahi PhD[5], Zahra Kashani-Khatib MSc[6], Meysam Kahiri MSC[2], Maryamsadat Hoseini MSc[2]

Original Article

Abstract

Background: The deficiency of factor XIII is a rare hemorrhagic disorder with the highest global incidence in Sistan and Baluchistan province in Iran. Bleeding of central nervous system (CNS) is a common but life-threatening clinical presentation of severe factor XIII deficiency. The aim of this study was to assess the role of Pro564Leu polymorphism in occurrence of intra- and extra-cranial hemorrhage in factor 13 deficiency.

Methods: 32 patients with factor XIII deficient and history of CNS bleeding and 32 patients with factor XIII deficiency but without CNS bleeding were selected as case and control groups. Initially, the baseline for the Trp187Arg polymorphism was evaluated in both groups to confirm the disorder. Then, all the patients were assessed for Pro564Leu polymorphism.

Findings: All the study patients were homozygote for factor XIII polymorphism. We also found that no patient in both groups was positive for Pro564Leu polymorphism.

Conclusion: It seems that Pro564Leu polymorphism do not have any effect on occurrence of CNS bleeding in factor XIII deficiency.

Keywords: Factor XIII deficiency, Central nervous system (CNS), bleeding, Pro564Leu polymorphism

Citation: Naderi M, Dorgalaleh A, Alizadeh Sh, Kazemi A, Tabibian Sh, Dargahi H, et al. **Role of Pro564Leu of FXIII-A Gene Polymorphism and Risk of Central Nervous Bleeding in Patients with Congenital Factor XIII Deficiency, Southeast of Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(272): 25-33

1- Associate Professor, Genetics of Non-Communicable Disease Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
2- Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Associate Professor, Department of Health Care Management, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- Department of Hematology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Shaban Alizadeh PhD, Email: alizadehs@sina.tums.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۲/هفته اول فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۲

موانع و محدودیت‌های کلینیکی انجام Small interfering RNA delivery (siRNA delivery) بر پایه‌ی وکتورهای غیر ویروسی

رضا قویمی[۱]، دکتر معراج پورحسین[۲]

مقاله مروری

چکیده

در سال‌های اخیر، ژن درمانی از طریق siRNA (Small interfering RNA) توجهات زیادی را معطوف خود ساخته است. این پدیده بر اساس PTGS (Post transcriptional gene silencing) استوار است. به دلیل نقایص وکتورهای ویروسی، استفاده از وکتورهای Non viral برای انتقال نوکلئیک اسید مورد توجه قرار گرفته است. درست است که وکتورهای Non viral نسبت به انواع ویروسی، میزان ترانسفکشن کمی دارند، اما Safety وکتورهای غیر ویروسی بسیار بیشتر می‌باشد. قابلیت‌های کلیدی siRNA مثل انطباق پذیری بالا، کاربرد در دوزهای کم و همه کاره بودن آن، سبب استفاده از siRNA در روش‌های انتقال ژن شده است. با این حال، دارای نقایصی مثل تحریک سیستم ایمنی و Off target silencing نیز می‌باشد. در این مقاله، بیشتر سعی بر این بود تا مشکلاتی که در سر راه انتقال siRNA به سلول وجود دارد، بررسی شود. با توجه به اطلاعاتی که در دست است، گفته می‌شود که پیشرفت هر چه بیشتر siRNA delivery می‌تواند در آینده به یک روش قابل اتکا جهت درمان بیماری‌هایی که پایه‌ی ژنتیکی دارند، مبدل گردد.

واژگان کلیدی: انتقال Small interfering RNA، ژن درمانی، وکتورهای غیر ویروسی

ارجاع: قویمی رضا، پورحسین معراج. **موانع و محدودیت‌های کلینیکی انجام Small interfering RNA delivery (siRNA delivery) بر پایه‌ی وکتورهای غیر ویروسی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۲): ۴۹-۳۴

مقدمه

Nucleic acid gene therapy نوید بخش درمان بسیاری از بیماری‌های حاد و مزمن می‌باشد. این استراتژی بر پایه‌ی دو الگوی متفاوت برقرار است: الف) وارد کردن ژن هدف به صورت‌های اولیگونوکلئوتید و یا به صورت پلازمید به منظور بازیابی و یا تحریک بیان پروتئین‌های درمانی، ب) ایجاد کردن اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس یا siRNA (Small interfering RNA) که جهت مداخله در عملکرد ژن‌های هدف و شروع فرایند Silencing می‌باشد. اگر چه وکتورهای ویروسی میزان بالایی از Transduction را دارند، اما خاصیت Immunogenicity در هنگام کاربرد آن‌ها پیشرفت و استفاده از وکتورهای ویروسی را با مشکل مواجه کرده است (۱).

در سپتامبر ۱۹۹۹ در دانشگاه Pensylvania محققان یک آزمایش ژن درمانی بر پایه‌ی آدنوویروس‌ها انجام دادند و بیمار یک پسر ۱۸ ساله دارای مشکل

۱- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر معراج پورحسین
Email: pourhossein@med.mui.ac.ir

Ornithine transcarbamylase deficiency بود. به علت واکنش‌های شدید ایمونولوژیکی نسبت به دوزهای بالای وکتور آدنوویروسی، این آزمایش ژن درمانی سبب مرگ این فرد شد. بعد از این حادثه بود که Safety وکتورهای ویروسی در کاربردهای ژن درمانی مورد تجدید نظر قرار گرفت (۲). در سیستم‌های انتقال ژن به صورت Non viral تلاش بر این بود که پروفایل‌های مربوط به Safety آن‌ها افزایش پیدا کند، اما کارایی فرایند Transfection در وکتورهای غیر ویروسی نسبت به انواع ویروس، کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهند (۳).

انتقال ژن به صورت غیر ویروسی از طریق مکانیسم RNA interference (RNAi)

استفاده از تکنولوژی RNAi (RNA interference) در روش‌های Functional genomics از طریق Genetic screening بر پایه‌ی DNAی سنتتیک برای اولین بار در Caenorhabditis elegans و دروزوفیلا نشان داده شد. محققان دریافتند که سلول‌ها می‌توانند از طریق یک مکانیسم جدید سنتز پروتئین را کنترل کنند که از طریق اتصال مولکول‌های کوچک RNA دو رشته‌ای به سکانس‌های ویژه‌ای از mRNA صورت می‌گیرد و در نتیجه، بیان پروتئین در ژن مربوط مهار می‌شود (۴). Elbashir و همکاران نشان دادند که طی فرایند RNAi، siRNAهایی با توالی ۲۱ نوکلئوتید در سلول‌های کشت داده شده‌ی پستانداران می‌توانند مداخله کنند (۵). آزمایش‌های پایه‌ای روی فرایند RNAi، منجر به اعطای جایزه‌ی نوبل در زمینه‌ی پزشکی و فیزیولوژی به دو دانشمند انجام دهنده‌ی تحقیقات شد (۶).

توانایی استفاده از dsRNA (Double-stranded RNA) جهت خاموش‌سازی بیان ژن با Specificity بالا، در مورد گیاهان و دروزوفیلا هم انجام شده است. دانشمندان دریافتند که در سلول‌های پستانداران، dsRNAهای طولانی‌تر از ۳۰ bp سبب شروع یک پاسخ ضد ویروسی شدید به نام پاسخ اینترفرون (IFN یا Interferon) می‌شوند که در نهایت می‌تواند از طریق فعال‌سازی RNaseL و تجزیه‌ی کلی مولکول RNA منجر به سرکوب بیان ژن شود. siRNAهای سنتتیک کمتر از ۳۰ bp که دارای سکانس مکمل با ژن هدف هستند، می‌توانند به جای dsRNAهای طویل‌تر به داخل سلول منتقل شوند (۷).

siRNA، کلیدی‌ترین مولکول در مسیر RNAi می‌باشد که ۲۵-۲۱ نوکلئوتید طول دارد و حاوی ۲ نوکلئوتید به صورت آویزان (Overhang) در دو انتهای '۳ می‌باشد. در داخل سیتوپلاسم، siRNA در داخل یک کمپلکس پروتئینی به نام RISC (RNA induced silencing complex) قرار می‌گیرد. سپس کمپلکس RISC تمام mRNA (Messenger RNA)های داخل سلولی را اسکن می‌نماید تا بتواند mRNAیی را که دارای سکانس مکمل با siRNA است، پیدا کند.

اگر mRNA هدف توسط کمپلکس RISC پیدا شد، بلافاصله برش می‌خورد و تجزیه می‌شود و در نتیجه، به طور موفقیت‌آمیزی از ترجمه‌ی ژن هدف جلوگیری به عمل می‌آید. بعد از مشارکت و قرارگیری siRNA در داخل کمپلکس RISC یکی از رشته‌های siRNA (رشته‌ی Sense) در بیرون از کمپلکس قرار می‌گیرد. در حالی که رشته‌ی دیگر

(رشته‌ی آنتی سنس) همچنان به کمپلکس RISC فعال شده، متصل باقی می‌ماند. سپس این رشته‌ی آنتی سنس به عنوان الگو (Template) جهت اتصال mRNA عمل می‌نماید.

برش در mRNA مکمل در نهایت منجر به فرایند Knockdown در پروتئین کد شده توسط mRNA می‌شود. از هنگامی که تشکیلات موجود در RNAi در سیتوپلاسم قرار گرفت، siRNA Effector می‌تواند به سیتوپلاسم سلول دسترسی پیدا کند (۸).

مزیت اصلی در تمام روش‌های آنتی سنس، ویژگی اختصاصیت بالای آن‌ها است که در آن تفکیک بین ژن هدف و غیر هدف (Non target) از طریق اختصاصیت واکنش‌های جفت شدگی بازها به صورت Watson-Crick انجام می‌گیرد. پتانسیل بالای RNAi روش‌های جدیدی را جهت خاموش‌سازی ژن در مقیاس بزرگ در مورد ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین در ژنوم انسان فراهم کرده است. اکنون این مطالعات، اطلاعات با ارزشی در مورد عملکرد ژن‌ها و تجزیه و تحلیل Pathwayها در اختیار ما قرار داده است. اختصاصیت بالا، حتی ممکن است این امکان را بدهد که بتوان آلل‌های ویژه‌ی مربوط به بیماری را که تفاوتشان با آلل‌های طبیعی تنها در موارد محدودی جایگزینی نوکلئوتیدی (Nucleotide substitution) است، هدف قرار داد (۹).

پتانسیل بالای RNAi به این معنا است که مولکول‌های RNA Effector در غلظت‌های بسیار کمی نسبت به اولیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس و یا ریبوزایم‌ها عمل می‌کند (۱۰). تداخل RNA همچنین نوید بخش استراتژی‌های جدیدی برای ارزیابی یا Validation اهداف دارویی و مطالعات Functional genomics است. همچنین برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مثل سرطان، بیماری‌های ژنتیکی و ویروسی کاربرد دارد (۱۱).

ویژگی‌های siRNA

اندازه‌ی متوسط مولکول siRNA کمتر از ۱۰ nm می‌باشد. به علاوه، طبیعت پلی آنیونی مولکول RNA، نفوذ آن به دیواره‌ی سلول را با مشکل مواجه کرده است. مولکول siRNA از نظر فارماکوکینتیکی ضعیف است؛ به طوری که باعث شده است مدت زمانی که داخل جریان خون گردش می‌کند، کم باشد (۶). به منظور افزایش اندازه، siRNA باید به صورت یک قطعه و یا اتصال شیمیایی (مثل باندهای دی سولفیدی، استرپتو آویدین یا بیوتین) به سایر اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها یا سطوح اتصال یابد تا بتواند مولکول بزرگ‌تری را از نظر اندازه ایجاد کند (۱۲).

راهکار دیگر، افزایش همزمان اندازه‌ی مولکول و افزایش پایداری در محیط‌های داخل و خارج سلولی است. پلیمرها و لیپوزوم‌ها با اتصال به siRNA، می‌توانند سبب تشکیل یک Nano particle شوند که می‌تواند علاوه بر افزایش اندازه‌ی مولکول، آن را از تجزیه شدن حفظ کند. اندازه‌ی Nano particle نقش مهمی در انتقال siRNA به بافت سرطانی دارد. بسیاری از نویسندگان مقالات، پیشنهاد می‌کنند که ذرات دارای قطر بین ۱۰۰–۱۰ nm (۱۳) تا حداکثر ۲۰۰ nm (۱۴)، اندازه‌ی مناسب برای وکتورهای غیر ویروسی دارند؛ زیرا آن‌ها به اندازه‌ی کافی بزرگ هستند که داخل خون باقی بمانند یا به اصطلاح Retention (رسوب) داشته باشند. از طرفی، به اندازه‌ی کافی هم کوچکند تا بتوانند به رسپتورهای

سطح سلول دست یابند و وارد سلول شوند. با این وجود، Nano particleهای کمتر از ۱۰ nm، توانایی Retention ندارند و از طریق جریان خون شسته می‌شوند. همچنین آن‌هایی که قطر بیشتر از ۱۰۰ nm دارند، این امکان وجود دارد که توسط ماکروفاژها فاگوسیته شوند. ماکروفاژها عامل شناسایی، بلع و تجزیه شدن ذرات بزرگ از طریق فرایندهایی به نام Opsonization هستند. در این فرایند، اپسونین‌ها که از ماکروفاژهای بالغ منشأ می‌گیرند، ذراتی مثل باکتری‌ها و همچنین Nano particle را احاطه می‌کنند و از بین می‌برند. به عبارت دیگر، فرایند Opsonization توسط ماکروفاژها مسؤول Half life کم ذرات بزرگ‌تر از ۱۰۰ nm می‌باشد (۶).

پایداری siRNA در محدوده‌ی pH فیزیولوژیک و کم بودن پاسخ‌های آنتی بادی قابل شناسایی توسط سیستم ایمنی و قابلیت تطابق پذیری زیستی (Biocompatibility) سبب کاربرد ساختارهای RNA در ژن درمانی شده است. توزیع siRNA در داخل بدن به صورت غیر اختصاصی می‌باشد. به این صورت که بعد از تجویز سیستمیک، در طی مسیر تا سلول هدف به صورت تدریجی از غلظت اولیه‌ی siRNA کاسته می‌شود و در آخر دوز، کمی نسبت به دوز اولیه‌ی دارو به سلول هدف می‌رسد که این امر، به خاطر موانع موجود در مسیر مثل عروق اندوتلیال و سایر موانع بافتی است (۶).

در صورت انتقال siRNA به صورت برهنه به داخل سلول‌ها، فرایند Knockdown موقتی در طول دوره‌ی ۷-۳ روزه در Cell lineهایی که رشد سریع دارند، اتفاق می‌افتد که به خاطر کم شدن تدریجی غلظت siRNA کمتر از میزان مؤثر و همچنین به خاطر تکثیر این سلول‌ها است. اما در سلول‌هایی که تقسیم نمی‌شوند یا کند تکثیر می‌شوند، اثر درمانی siRNA می‌تواند تا ۳ هفته هم به طول انجامد (بعد از آن siRNA به صورت طبیعی تجزیه می‌شود) (۱۵).

ویژگی‌های سیستم‌های انتقال غیر ویروسی

الف- حفاظت از siRNA

بعد از تجویز سیستمیک Naked siRNA (تجویز شده بدون وکتور) به طور سریع توسط سرم و نوکلئازهای بافتی تجزیه می‌شود و از طریق کلیه دفع می‌گردد و یا این که توسط ماکروفاژهای سیستم فاگوسیت کننده‌ی تک هسته‌ای (MPS یا Mononuclear phagocyte system) به دام می‌افتد. نتیجه این است که آن‌ها وقت کافی برای رسیدن به موضع هدف و انجام عملکرد خود را نخواهند داشت. در نتیجه، فرایند Gene silencing با شکست مواجه می‌شود. چندین امکان وجود دارد که بتوان مدت زمان حضور سیستم انتقال را در جریان خون طولانی‌تر کرد و بتوان siRNA را از بی‌اثر شدن و تجزیه شدن حفظ نمود. به عنوان مثال، siRNA می‌تواند از طریق شیمیایی تغییر یابد (برای مثال از طریق Phosphodiester modification (۱۶) یا ' Sugar modification۲ (۱۷) و یا می‌توان از روش‌های Bioconjugation استفاده کرد (به عنوان مثال در یک یا هر دو رشته‌ی siRNA، ذرات لیپید اضافه کرد). روش دیگر، استفاده از یک وکتور سینتیک است که باید ویژگی پایدار بودن داشته باشد. به عنوان مثال، می‌توان siRNA را با لیپیدها یا پلیمرهای با بار مثبت ترکیب کرد و یا siRNA را داخل ذرات لیپیدی کپسوله کرد (۱۸).

ب- پایداری و دارا بودن ویژگی‌های مخفی ماندن

خاموش‌سازی ژن به صورت مؤثر نیازمند پایدار بودن وکتور بر ضد تجزیه شدن در داخل خون می‌باشد. همچنین سیستم انتقال باید در خون مخفی بماند تا ماکروفاژها نتوانند آن را شناسایی و فاگوسیته نمایند. بار سطحی وکتور عامل مهمی در پایداری آن به شمار می‌آید. در شرایط In vitro، مثبت بودن بار در سطح مزیت مهمی در مؤثر بودن انتقال به شمار می‌رود؛ زیرا می‌تواند سبب تسهیل اتصال به دیواره‌ی سلول حاوی بار منفی شود و در نتیجه، سبب تحریک Cell uptake می‌شود (۱۹). جهت کاربردهای in vivo بار سطحی مثبت یک نقص به شمار می‌رود؛ زیرا بر اثر واکنش با پروتئین‌های سرم مثل آلبومین و یا لیپوپروتئین‌ها یا پروتئین‌هایی مثل IgG که بار منفی دارند، مانع فرایند Cell uptake می‌شود.

Zelphati و همکاران نشان دادند که واکنش‌های غیر اختصاصی بین لیپیدهای با بار مثبت (Cationic lipids) و پروتئین‌های سرم، منجر به خنثی‌سازی بارهای مثبت و همچنین افزایش اندازه و در نتیجه سبب تجمع کمپلکس‌های خنثی‌سازی شده می‌شود. خنثی‌سازی بار، سبب کاهش واکنش با دیواره‌ی سلول می‌شود و افزایش اندازه باعث می‌شود که کمپلکس حاوی siRNA و لیپیدها نتوانند وارد سلول شوند و تجمع این ذرات در خون سبب آمبولی ریه خواهد شد (۲۰).

یک نکته‌ی مهم دیگر این است که کمپلکس‌های کاتیونی می‌تواند سبب فعال شدن سیستم کمپلمان شود که می‌تواند منجر به Opsonization و در نهایت پالایش کبدی گردد. برای محدود کردن این واکنش‌ها با پروتئین‌های باردار سرم، می‌توان دور تا دور وکتور را با پلیمرهای هیدروفیلیک مثل پلی اتیلن گلیکول (PEG یا Polyethylene glycol) یا پلی وینیل پرولیدون (PVP یا Polyvinylpyrrolidone) پوشاند که با تشکیل شبکه‌ای سخت و هیدروفیل در اطراف وکتور، سبب محدود کردن واکنش‌های هیدروفوبیک یا الکترواستاتیک با مایع خارج سلولی می‌شود. نتیجه‌ی این کار زمان طولانی‌تر برای گردش در داخل خون و همچنین جلوگیری از جذب شدن توسط MPS و ایجاد وکتوری پایدار و حاوی ویژگی‌های اختفا در جریان خون است (۲۱).

ج- انجام فرایند Targeting

بعد از حضور سیستم انتقال در داخل جریان خون، این سیستم باید بتواند به سلول یا بافت هدف خود برسد. وقتی که بافت هدف یک تومور باشد، در کل Targeting ligandها غیر ضروری هستند. در مورد سلول‌های توموری در خارج از MPS، حالت Passive targeting می‌تواند ایجاد شود (۲۲).

انواع مختلفی از لیگاندها در این حالت قابل استفاده هستند: (مولکول‌های گلیکوزیله، پپتیدها، پروتئین‌ها یا آنتی بادی‌ها). استفاده از لیگاند به محل استقرار تومور و ویژگی‌های سلولی و بافتی آن بستگی دارد. Mannose receptors و گیرنده‌های وابسته به مانوز برای ماکروفاژها و یا دندریتیک سل‌ها به صورت Tissue specific هستند و مانوز را به عنوان لیگاند شناسایی می‌کنند. رسپتورهای ترانسفرین یا رسپتورهای فولات، بر عکس موارد قبل به صورت Tissue unspecific هستند؛ زیرا روی انواع مختلف سلول‌ها حضور دارند. اما نکته‌ی مهم این است که این دو دسته از رسپتورها بر روی خیلی از سلول‌های توموری Over express می‌شوند. بنابراین، اگر هدف

دسترسی به سلول‌های توموری باشد، بهترین لیگاندها می‌توانند فولات و یا ترانسفرین باشند. این لیگاندها اغلب روی زنجیره‌های PEG قرار می‌گیرند که این وضعیت سبب تسهیل اتصال سیستم انتقال و رسپتور قرار گرفته روی سطح سلول هدف می‌شود و می‌تواند به داخل شدن وکتور حامل siRNA کمک نماید (۲۳).

د- انتقال siRNA به سیتوپلاسم و انجام عملکرد مربوط به siRNA

بعد از این که سیستم انتقال به صورت اولیه وارد سلول شد، اغلب توسط قطعات داخل سلولی با PHهای متفاوت (شامل اندوزوم اولیه، اندوزوم ثانویه و لیزوزوم) می‌توانند تجزیه شوند. برای رسیدن به سیتوپلاسم، سیستم انتقال یا حداقل siRNA مجبور است که از اندوزوم فرار کند. بعد از فرار از اندوزوم، سیستم انتقال، محموله‌ی خود (siRNA) را در داخل سیتوپلاسم آزاد می‌کند و سپس siRNA وارد هسته می‌شود و عملکرد gene silencing را انجام می‌دهد (۱۱).

کاربردهای بالقوه‌ی siRNA در درمان سرطان

پیشرفت سرطان تدریجی و حاصل فرایندهای پیچیده است که اغلب با تجمع تغییرات و نقایص ژنتیکی همراه است و در نهایت منجر به تغییر عملکرد در انکوژن‌ها و عدم عملکرد Tumor suppressor geneها می‌شود. اغلب تغییرات ژنتیکی که سبب رفتار بدخیم تومور می‌شود، منجر به تکثیر سریع سلول، تهاجم به بافت‌های مجاور، متاستاز از محل اولیه‌ی تومور، تشکیل عروق خونی جدید و مقاومت به داروهای شیمی درمانی می‌شود. هدف ژن درمانی سرطان از طریق siRNA، در واقع تصحیح این تغییرات ژنتیکی از طریق سرکوب ژن‌های عامل سرطان یا بیان مجدد Gene tumor suppressorها است. به علاوه، ثابت شده است که کارآمدی Silencing در دوزهای یکسان در مورد siRNA نسبت به اولیگو نوکلئوتیدهای آنتی سنس و روش‌های ریبوزایم خیلی بیشتر است (۲۴).

یکی از عوامل مهم برای ژن درمانی بر پایه‌ی RNA، انتخاب درست ژن هدف یا Target gene می‌باشد. تلاش‌های زیادی به منظور شناسایی ژن هدف در ژن درمانی صورت گرفته است. معمول‌ترین اهداف در این زمینه شامل موارد زیر است:

الف- هدف قرار دادن ژن‌هایی که در چرخه‌ی سلول نقش دارند

P_{53} که به عنوان محافظ ژنوم عمل می‌کند، در بیش از ۵۰ درصد از سرطان‌های انسانی به وسیله‌ی Point mutation، غیر فعال می‌گردد. siRNA می‌تواند به منظور سرکوب بیان P_{53} موتانت استفاده گردد (۲۵).

مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول یا آپوپتوز در اغلب سرطان‌ها به خصوص در تومورهایی که به دارو مقاومند، مختل می‌شود. درمان با siRNA می‌تواند سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از طریق هدف قرار دادن عوامل ضد آپوپتوز مثل AKT_1، Survivin و Bcl_2 شود. سرکوب این ژن‌های ضد آپوپتوز توسط siRNA در بسیاری از سرطان‌ها، سبب القای آپوپتوز در سلول و در نتیجه، سبب حساس شدن سلول‌های سرطانی به شیمی درمانی می‌شود (۲۶). به خصوص، Survivin از این نظر که فقط در بافت‌های جنینی و سرطانی وجود دارد و در بافت‌های طبیعی بالغ وجود ندارد، توجهات زیادی را

بـه خـود معطـوف کـرده اسـت. بنـابراین، فراینـد Silencing روی Survivin مـی‌توانـد یـک فراینـد Tumor specific therapy بدون آسیب به بافت‌هـای طبیعی و سالم باشد (۶).

ب- هـدف قـرار دادن ژن‌هـای دخیـل در Signal transduction

افـزایش دانسـته‌هـای مـا در مـورد مسـیرهای Cell signaling سلول‌های نئوپلاستیک منجر به کشف چندین داروی جدید ژن درمانی شده است کـه شـامل مهار کننده‌هـای پـروتئین تیـروزین کینـاز (Gleevec)، Bcr-ABL۱ و مونرکلونال Ab بر ضد رسـپتور عصـبی Her۲ (Herceptine) مـی‌باشـند. ممانعـت از عملکـرد پروتئین‌های دخیل در فرایند Transduction signal به ویژه پروتئین کینازها، به طور موفقیت‌آمیزی می‌تواند از پیشرفت سرطان جلوگیری کند (۶).

ج- هدف قرار دادن ژن‌های دخیل در آنژیوژنز

عامـل رشـد عـروق انـدوتلیال (VEGF یـا Vascular endothelial growth factor) نقش کلیدی را در فرایند آنژیوژنز در طول توسعه‌ی سـرطان ایفـا می‌کند. در طول مطالعـات اثبـات گردیـده اسـت کـه siRNA تا حدودی بـه طـور کامـل مـی‌توانـد سـبب ممانعت از ترشـح عامـل رشـد در رده‌ی سـلول‌هـای سرطان پروستات در انسان شود. همچنین به صـورت موفقیت‌آمیزی سبب سرکوب آنژیوژنز و رشد تومـور در مدل موشی Xenograft شده است (۶).

د- هدف قرار دادن ژن‌های دخیل در مقاومت دارویی

یکی از عوامـل اصـلی در شـیمی درمـانی نـاموفق در بیماران سرطانی، گلیکوپروتئین P و مقاومت دارویـی چندگانـه‌ی وابسـته بـه MDR۱ (Multi-drug resistance۱) مـی‌باشـد. بـا کـاربرد siRNA بر ضد ژن‌هـای MDR۱ و گلیکـوپروتئین P، مشاهده شده است که بیـان ایـن دو ژن تـا میـزان ۹۰ درصد در شرایط In vitro و تـا میـزان ۷۵ درصـد در مدل موشی کاهش یافته است (۲۴).

مهم‌ترین محدودیت‌های siRNAها

الف- تحریک سیستم ایمنی ذاتی

تحریـک پاسـخ‌هـای ایمنـی وابسـته بـه siRNA در مهـره‌داران توسـط (Double-stranded RNA) dsRNA، مکانیسمی جهت دفاع در مقابل عفونت‌های ویروسی است. dsRNAها در سیتوپلاسم توسط کیناز وابسـته بـه RNA (PKR یـا Protein kinase R) شناسایی می‌شوند و این امر سبب فعـال‌سـازی PKR مـی‌شـود و فعـال شـدن PKR در نهایـت منجـر بـه تحریک پاسخ اینترفـرون (IFN) مـی‌گـردد (۶). طـی تحقیقاتی که انجـام گرفتـه اسـت، مشـخص شـد کـه موتیـف‌هـایی از تـوالی‌هـای خاصـی از siRNA کـه حـاوی سـکانس ۳'(GUCCUUCAA)۵' هسـتند، توسـط TLR۷ (Toll-like receptor۷) شناسـایی می‌شود و سبب فعال شـدن پاسـخ ایمنـی مـی‌گـردد (۲۷). در سال‌های بعد، این موتیف را Danger motif نام‌گذاری کردند کـه در واقـع ناحیـه‌ای غنـی از GU است که با تحریـک سیسـتم ایمنـی ذاتـی سـبب آزاد شدن سیتوکین‌های التهابی می‌شود (۲۸).

ب- Suppression of off targets

اثـر Off Target در siRNA، در واقـع مربـوط بـه خاموش‌سازی ناخواسته‌ی ژن‌های دیگری بـه غیـر از ژن مـورد نظـر مـی‌باشـد. مطالعـات زیـاد روی Off target silencing انجام گرفته اسـت، زیـرا ایـن پدیده می‌تواند منجـر بـه عـوارض جـانبی غیـر قابـل

پیش‌بینی شود. بررسی فعالیت ژن‌ها در کل ژنوم توسط کلینیک Microarray نشان داده است که سلول‌های تیمار شده با siRNA در طیف وسیعی از ژن‌ها حالت Off target silencing را نشان می‌دهند (۲۹). این حالت پدیده‌ای ناخواسته است و اثرات سلولی حاصل از تغییر فعالیت ژن در آن نامشخص و غیر قابل پیش‌بینی است. مطالعه روی سلول‌های ترانسفکت شده در شرایط In vitro نشان می‌دهد که یک سوم از سلول‌های تیمار شده با siRNA که به صورت تصادفی انتخاب شده‌اند، زنده مانده‌اند. آنالیزهای اولیه نشان داده‌اند که در کمتر از ۱۱ نوکلئوتید بین siRNA و ژن هدف، مطابقت (Matching) وجود دارد که می‌تواند ناشی از Off target knockdown باشد. مطالعات بیشتر حاکی از آن است که اغلب پدیده‌های Off targeting که از نظر آزمایشگاهی تأیید شده‌اند، به تعداد ۷-۶ نوکلئوتید با siRNA مطابقت داشته‌اند که به این ناحیه در اصطلاح Seed region گفته می‌شود (۳۰).

تحقیقات اخیر پیشنهاد می‌کند که با انجام تغییرات شیمیایی به صورت ۲'O methylation، در باز دوم از رشته‌ی رهبر siRNA، می‌توان به صورت موفقیت‌آمیزی سبب کاهش پدیده‌ی Off targeting شد، بدون این که اثر سوئی روی خاموش‌سازی ژن هدف داشته باشد (۳۱).

مشکلات در راه دستیابی سیستم انتقال به هدف خود در سلول و چگونگی غلبه بر این مشکلات

الف- نفوذ به دیواره‌ی سلول و فرار از سیستم Reticulo endothelial system) RES)

بعد از این که siRNA به سلول مورد نظر رسید، باید بتواند وارد سلول شود و سپس از سیستم RES فرار کند. اگر سیستم حاوی siRNA و وکتور آن حاوی بار مثبت باشند، با بار منفی سطح سلول هدف واکنش می‌دهد و یک وزیکول اندوسیتوزی تشکیل می‌شود. همچنین لیگاندها یا آنتی بادی‌ها می‌توانند روی سطح وکتور قرار گیرند تا حالت اندوسیتوز وابسته به رسپتور القا گردد. بعد از وارد شدن به این شیوه -که کمپلکس وارد اندوزوم می‌شود-، اگر کمپلکس حاوی siRNA قادر به فرار از اندوزوم نباشد، در نهایت الحاق لیزوزوم و اندوزوم اتفاق می‌افتد و به خاطر pH کم و تحت اثر آنزیم‌ها، این کمپلکس تجزیه خواهد شد (۳).

راهکارهایی جهت خلاصی از اندوزوم وجود دارد. پلیمرهایی مثل پلی اتیلین ایمین (PEI یا Polyethylenimine) قابلیت این را دارند که سبب القای شروع آزادسازی از اندوزوم شوند. فرضیه‌ی Proton sponge اشاره به این موضوع دارد که به خاطر ظرفیت PEI در محدوده‌ی وسیعی از pH، این پلیمر می‌تواند هنگامی که pH داخل اندوزوم پایین می‌آید، به حالت پروتونه در آید که سبب ورود یون کلرید و متعاقب آن ورود پروتون‌ها و آب به اندوزوم شود. به خاطر افزایش فشار اسمزی، اندوزوم پاره می‌شود و siRNA در سیتوپلاسم آزاد می‌گردد (۳۲).

یک مکانیسم دیگر در رابطه با فرار از اندوزوم وابسته به Lipoplexها است که از طریق بی‌ثبات کردن دیواره‌ی سلول انجام می‌پذیرد. در این فرضیه، کمپلکس از طریق اندوزوم وارد می‌شود که نتیجه‌ی این عمل، ایجاد حالت Flip Flop در لیپیدهای آنیونی دیواره‌ی اندوزوم است. این حالت می‌تواند از سمت سیتوپلاسمی به طرف لیپیدهای کاتیونی در کمپلکس

ادامه پیدا کند و سبب آزاد شدن siRNA در سیتوپلاسم شود (۳۳).

ب- فعال کردن سیستم ایمنی ذاتی

انتقال کمپلکس حاوی لیپوزوم و siRNA می‌تواند منجر به فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی پستانداران شود. در نتیجه، سیتوکین‌های التهابی تحریک می‌شوند و پاسخ‌های اینترفرون ایجاد می‌شود که در اصل، به خاطر RNA sensing toll like receptor (۸، ۷ و ۳ TLRs) می‌باشد. فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی القا شده توسط siRNA می‌تواند منجر به نتایج مثبت کاذب شبه ویروسی شود. برای جلوگیری از فعال شدن سیستم ایمنی، مشخص شده است که در صورت انجام Chemical modification روی Long dsRNAهایی با طول ۳۰ نوکلئوتید و کاهش طول آن‌ها به ۲۱-۱۹ نوکلئوتید، پاسخ ایمنی کمتر تحریک خواهد شد (۸). همچنین Abrams و همکاران مشاهده کردند که کاربرد دگزامتازون، می‌تواند با مهار آزادسازی سیتوکین‌های التهابی، مانع فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی گردد. در حالی که همچنان عملکرد Gene silencing حفظ می‌شود (۳۴).

ج- انجام فرایند PEGylation به منظور مخفی ماندن لیپوزوم‌ها

استفاده از پوشش PEG، به منظور تسهیل گردش طولانی مدت لیپوزوم در جریان خون برای سال‌ها مطالعه شده است. مزیت اصلی پوشش PEG در این است که می‌تواند اتصال پروتئین‌ها به سطح لیپوزوم‌ها را کم کند و بنابراین، سبب کاهش Opsonization و حذف به وسیله‌ی ماکروفاژهای سیستم RES شود. برای به حداکثر رساندن عدم جذب توسط سیستم RES و اپسونیزاسیون به وسیله‌ی ماکروفاژها، یک سپر کامل از PEG باید دور تا دور وکتور ایجاد شود تا مؤثرترین مانع بر سر اتصال پروتئین‌ها شکل گیرد (۸). تراکم زیاد به میزان ۱۰-۸ درصد از PEG، لازمه‌ی مخفی ماندن مناسب لیپوزوم در خون است. به هر حال، تراکم خیلی بالای PEG مانع از رهاسازی محموله‌ی لیپوزوم -siRNA- خواهد شد (۳۵).

د- پدیده‌ی حذف یا پالایش سریع از گردش خون (Accelerated blood clearance)

در صورت کاربرد لیپوزوم‌های طبیعی و پایدار، تزریقات مکرر این لیپوزوم‌ها، منجر به تغییر یافتن توزیع آن در بدن می‌شود. لیپوزوم‌هایی که با PEG پوشانده شده‌اند، بعد از مدتی از گردش خون حذف می‌شوند و در کبد تجمع می‌یابند. این پدیده به نام ABC phenomenon شناخته می‌شود (۳۶). بعد از تجویز دوز اول از لیپوزوم‌های پوشیده شده از PEG، در بدن IgM (Immunoglobulin M) بر ضد PEG توسط Bcellهای طحال ایجاد می‌شوند. بعد از تزریقات مکرر در چندین روز بعدتر، این امر سبب فعال شدن سیستم کمپلمان می‌شود که منجر به اپسونیزاسیون کمپلکس و به دام افتادن آن‌ها در سلول‌های کبدی می‌گردد (۸). فرایند ABC یک فرایند وابسته به اندازه‌ی کمپلکس می‌باشد. از این رو، اگر اندازه‌ی کمپلکس حاوی لیپوزوم و PEG بیشتر از ۳۰-۱۰ nm باشد، این پدیده رخ نخواهد داد (۳۷).

وارد کردن این ساختارها به درون سلول از طریق وکتورهای غیر ویروسی

در حالت کلی دو روش تزریق local و Systemic جهت انتقال کمپلکس حاوی siRNA به درون بدن

وجود دارد. در حالت Local تزریق مستقیم در داخل مواضع هدف، ما را از این که دوز دقیقی وارد موضع هدف شده است، مطمئن می‌سازد. همچنین مشکل تجمع غیر اختصاصی که در روش تزریق داخل وریدی وجود دارد، در این روش برطرف می‌شود. تزریق مستقیم داخل توموری، یک روش شایع برای ایجاد پاسخ‌های ضد توموری توسط siRNA می‌باشد (۳۸). مزایای این روش در درجه‌ی اول فرمولاسیون ساده و سهولت تجویز جزء دارویی می‌باشد و در درجه‌ی دوم، دوزهای پایینی استفاده می‌شوند که سبب محدود شدن پاسخ‌های ایمنی سلولی وابسته به دوز می‌شوند؛ اما این روش تنها در مورد بافت‌هایی قابل انجام است که قابل دسترسی باشند (۱۱).

در روش تزریق سیستمیک جزء دارویی، مهم‌ترین مشکلی که پیش می‌آید، مشکل بودن انتقال siRNA است که به خاطر وجود موانع متعدد همچون سیستم گردش خون، سیستم رتیکلواندوتلیال و طولانی بودن مسیر انتقال می‌باشد.

تجویز سیستمیک، یک روش مناسب برای درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان و بیماری‌های متابولیکی است. جایی که ناحیه‌ی مورد نظر برای هدف قرار دادن سلول توموری به راحتی در دسترس نباشد و می‌تواند به وسیله‌ی روش‌های داخل وریدی، داخل پریتوئن و زیر جلدی انجام گیرد. در بین این روش‌ها، روش داخل وریدی بیشترین کاربرد را در درمان دارد. سهولت و سادگی این روش و همچنین سریع بودن نفوذ و توزیع جزء دارویی در مکان‌های متفاوتی از بافت از دلایل کاربرد بیشتر این روش می‌باشند (۳۹).

وکتورهای غیر ویروسی جهت انتقال siRNA به داخل سلول شامل انواع لیپیدی و پلیمری می‌باشد.

سیستم‌های انتقال (Delivery vector) بر پایه‌ی لیپیدها شامل انواع مختلفی هستند

الف- Liposome

لیپوزوم‌ها به طور وسیعی جهت انتقال جزء دارویی به سلول هدف استفاده می‌شوند. در بین وکتورهای غیر ویروسی، لیپوزوم‌ها جزء اولین گزینه‌هایی بودند که مورد مطالعه قرار گرفتند و بنابراین، ویژگی‌های آن‌ها به خوبی شناخته شده است (۴۰). مزیت لیپوزوم‌ها در این است که در اندازه‌ی حدود ۱۰۰ nm فرموله می‌شوند و محصولات ایجاد شده از آن‌ها، خاصیت Biocompatibility دارند. فرایند کپسوله کردن siRNA در داخل لیپوزوم ساده است و شامل ترکیب کردن siRNA و لیپوزوم و انکوبه کردن این دو می‌باشد (۶).

ب- Lipoplex

به منظور حداکثر کردن پایداری و کارایی هر چه بهتر فرایند انتقال و کمتر کردن سمیت، باید ترکیب لیپیدها و میزان لیپید به siRNA تنظیم شود. Lipoplexها به خاطر دارا بودن ویژگی‌هایی مثل سادگی تولید، دارا بودن خاصیت Transfection بالا و تعامل خوب با بار منفی دیواره‌ی سلول، به طور معمول استفاده می‌شود. اما به هر حال معایبی هم دارند که شامل پایداری کم و خاصیت Reproducibility ضعیف است (۴۱).

ج- PEGylated lipids

فرایند Pegylation به طور رایج در روش‌های Passive targeting مورد استفاده قرار می‌گیرد و در آن، PEG را روی سطح خارجی Nano vector وصل می‌کنند (۳).

به منظور دور زدن مشکل بار مثبت، پلیمرهای هیدروفیلیک مثل PEG به منظور ایجاد سپر و محافظی در مقابل بار سطحی لیپیدهای کاتیونی یا لیپوزوم‌ها استفاده می‌شوند و اتصال کوالان PEG و فسفولیپید، سبب افزایش مدت زمان حضور درجریان خون و کاهش اپسونیزاسیون و در نهایت فرار سلول از سیستم RES خواهد شد (۴۱).

د- Neutral lipid

به غیر از فرایند Pegylation، راه دیگر برای جلوگیری از Toxicity و پاسخ‌های التهابی وکتورها، استفاده از لیپیدهای خنثی است. اگر چه لیپیدهای خنثی Safety مطلوبی دارند، اما فقدان واکنش با بار منفی siRNA، استفاده از آن را محدود کرده است (۴۱). روشی برای غلبه بر این مشکل وجود داردکه شامل اتصال siRNA و لیپیدها به هم به صورت اتصال مستقیم به جای استفاده از واکنش الکترواستاتیک است. ثابت شده است که اتصال شیمیایی siRNA به کلسترول، می‌تواند سبب تسهیل Cell uptake گردد (۱۸).

سیستم‌های انتقال بر پایه‌ی پلیمرها نیز انواع مختلفی دارند

الف- PEI (پلی اتیلن ایمین)

یک پلیمر سنتتیک بسیار شاخه‌دار و با بار مثبت می‌باشد. به خاطر توانایی بالای آن در متراکم کردن اسید نوکلئیک‌ها و تداخل در اندوسیتوز، PEI با وزن مولکولی کم و با درجات مختلف از شاخه‌دار بودن برای انتقال ژن استفاده می‌شود. در برخی مطالعات، سمیت بالای PEI در شرایط in vitro به اثبات رسیده است. برای کم کردن سمیت، ترکیبی از PEI و PEG استفاده می‌شود و با انجام فرایند Pegylation، از سمیت PEI به میزان قابل ملاحظه‌ای کم می‌شود. اما نکته‌ی مهم این است که با اتصال PEG روی PEI، اندازه‌ی مولکول بزرگ‌تر خواهد شد (۶). PEI به خاطر کارآمدی بالا در ترانسفکشن، درجات بالای شاخه‌دار بودن و دارا بودن وزن مولکولی پایین، به عنوان Gold standard در انتقال ژن در شرایط in vivo در نظر گرفته می‌شود (۴۱).

ب- Chitosan

یک پلیمر پلی ساکاریدی با بار مثبت که در طبیعت به وفور یافت می‌شود و کاربردهای پزشکی فراوانی از تهیه‌ی بانداژ پزشکی تا ژن درمانی دارد. کیتوزان به خاطر داشتن ویژگی‌هایی مثل طبیعی بودن، Biocompatibility، Biodegradability و سمیت خیلی کم، پتانسیل بالایی در روش‌های انتقال ژن دارد. به علاوه، ویژگی چسبیدن به موکوس و نفوذ راحت به داخل سطوح موکوسی در کیتوزان، سبب شده است که به صورت ویژه در روش‌های انتقال ژن به داخل ریه کاربرد داشته باشد. متأسفانه میزان ترانسفکشن کیتوزان در حد متوسطی است که به خاطر ضعف آن در فرار از اندوزوم می‌باشد (۶).

ج- PLGA- (Poly(lactic-co-glycolic acid)) یا پلی لاکتیک گلیکولیک اسید)

تطابق پذیری PLGA، سبب سهولت انجام تغییرات شیمیایی به منظور انتقال هر چه مؤثرتر ژن می‌شود. همچنین دارای خاصیت Biodegradability و Biocompatibility می‌باشد (۴۱).

نمونه‌هایی از کاربردهای بالینی siRNA

استفاده از روش‌های غیر فعال‌سازی ژن مبتنی بر

siRNA در طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله انواع سرطان‌ها، بیماری‌های ویروسی، بیماری‌های چشمی و استخوانی با موفقیت انجام گرفته است. در تمامی این موارد، انجام درمان از طریق غیر فعال کردن عوامل و ژن‌های دخیل در فرایند بیماری‌زایی بوده است (۴۲).

الف: کاربرد siRNA بر علیه سرطان

استفاده از شیمی درمانی با وجود از بین بردن سلول سرطانی، سبب نابودی سلول‌های سالم نیز می‌گردد. از این رو، می‌توان از siRNA، فقط جهت هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی استفاده کرد. کاربرد موفق siRNA به منظور جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی در بسیاری از مطالعات گزارش شده است. به عنوان مثال، بیماران مبتلا به سرطان پروستات (۴۳) و تومور Ewing (۴۴) بدین صورت درمان شده‌اند. در دو مورد دیگر، siRNA بر علیه کیناز AKT۲ (۴۵) و عامل ABCC۴ (۴۶) استفاده شده است. این دو عامل به ترتیب در سرطان بدخیم گیلیوما و سرطان پانکراس بیان بالایی دارند. از این رو، در چنین مواردی از siRNA جهت کاهش بیان استفاده می‌شود.

ب: کاربرد siRNA بر علیه بیماری‌های ویروسی

درمان بر پایه‌ی siRNA جهت جلوگیری از عفونت‌زایی و عملکرد غیر طبیعی انواع مختلفی از ویروس‌ها انجام می‌گیرد. عفونت‌های ناشی از ویروس‌هایی همچون ویروس آنفولانزا (۴۷)، کوکساکی (۴۸)، (Respiratory syncytial virus) RSV (۴۹) و هپاتیت B (۵۰) از طریق siRNA درمان شده‌اند. همچنین از مکانیسم siRNA به منظور هدف قرار دادن ترکیبات مهم و حیاتی در چرخه‌ی زندگی ویروس HIV (Human immunodeficiency virus) استفاده شده است. رسپتورهای HIV نظیر CD۴ و کورسپتورهایی همچون CXCR۴ (C-X-C chemokine receptor type۴) و CCR۵ (C-C chemokine receptor type۵) هدف‌های بالقوه‌ای در این جهت می‌باشند؛ زیرا ممانعت از عملکرد این عوامل، سبب جلوگیری از ورود ویروس به داخل سلول میزبان خواهد شد (۵۱).

ج: کاربرد siRNA بر علیه بیماری‌های چشمی

برخی از بیماری‌های چشمی، مانند رتینوپاتی دیابتیک، بیماری (تحلیل رفتن عنبیه در اثر کهنسالی (Age-related macular degeneration یا AMD) و بیماری Herpetic Keratitis در اثر فرایند آنژیوژنز ایجاد می‌گردند. عامل VEGF نقش مهمی در این زمینه ایفا می‌کند. درمان با siRNA در مورد این دسته از بیماری‌های چشمی استفاده شده است (۵۲).

د: کاربرد siRNA بر علیه بیماری‌های استخوانی

کاتپسین B که یک سایتوکاین است، در تخریب غضروف، در بیماری‌های Osteoarthritis و ایجاد پروتئولیز در آرتریت روماتوئید، نقش مهمی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که هدف قرار دادن کاتپسین B می‌تواند سبب کاهش ۷۰ درصدی بیان این عامل شود. به این خاطر، کاهش بیان کاتپسین B به عنوان یک هدف جهت بهبود وضعیت این بیماران پیشنهاد می‌شود (۵۳).

نتیجه‌گیری

به منظور انتقال ژن به داخل تومور، سیستم انتقال باید بتواند سلول هدف را بشناسد و از اتصال غیر اختصاصی و ورود به سلول‌های دیگر ممانعت نماید. همچنین باید نسبت به تجزیه شدن در هنگام قرار

گرفتن در جریان خون مقاوم باشد و هنگامی که به سلول هدف رسید، باید بتواند از دیواره عبور نماید و همچنین قابلیت فرار از سیستم اندوزوم و لیزوزوم را داشته باشد و در نهایت با رها کردن محموله‌ی خود –siRNA– بتواند عملکرد نهایی خود را انجام دهد.

Non specific gene silencing و اثر Off targeting می‌تواند از طریق تغییر در اندازه‌ی siRNA و دستکاری توالی‌های اولیه، کمتر شود. رشته‌ی Sense در siRNA، پتانسیل بالایی برای انجام تغییرات دارد؛ طوری که با انجام تغییرات روی رشته‌ی Sense، هیچ گونه اثر سوئی در فرایند Silencing به وجود نمی‌آید.

همان گونه که ذکر شد، اندازه‌ی مناسب برای سیستم انتقال بین ۱۰ nm تا حداکثر ۲۰۰ nm می‌باشد. نکته‌ی آخر، عملکرد صحیح siRNA می‌باشد که مشخصه‌ی نتیجه بخش بودن Gene silencing است. در تمام مقالات مربوط به siRNA delivery انتقال ژن صورت گرفته است، اما میزان خاموش‌سازی ژن در بین این تحقیقات متفاوت بوده است. هدف، انجام Gene silencing بدون تحریک سیستم ایمنی و کم کردن و یا حذف کردن اثر Off targeting است. به این منظور، سیستم‌های انتقال باید تا حد امکان پایدار باشند. پارامترهای دیگر مثل میزان دوز استفاده شده و دفعات تزریق نیز در رسیدن به نتیجه‌ی مطلوب موثر می‌باشند.

References

1. Hoag H. Careers and Recruitment Gene therapy rising? Nature 2005; 435: 530-1.
2. Hollon T. Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. Am J Ophthalmol 2000; 129(5): 701.
3. Xu J, Ganesh S, Amiji M. Non-condensing polymeric nanoparticles for targeted gene and siRNA delivery. Int J Pharm 2012; 427(1): 21-34.
4. Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002; 418(6894): 244-51.
5. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001; 411(6836): 494-8.
6. Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoeprich S, Guo S, et al. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. Adv Drug Deliv Rev 2010; 62(6): 650-66.
7. Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. J Control Release 2007; 121(1-2): 64-73.
8. Buyens K, De Smedt SC, Braeckmans K, Demeester J, Peeters L, van Grunsven LA, et al. Liposome based systems for systemic siRNA delivery: stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. J Control Release 2012; 158(3): 362-70.
9. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59(2-3): 75-86.
10. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell 2003; 115(2): 199-208.
11. David S, Pitard B, Benoit JP, Passirani C. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. Pharmacol Res 2010; 62(2): 100-14.
12. Xu S, Dong M, Liu X, Howard KA, Kjems J, Besenbacher F. Direct force measurements between siRNA and chitosan molecules using force spectroscopy. Biophys J 2007; 93(3): 952-9.
13. Gao H, Shi W, Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005; 102(27): 9469-74.
14. Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG. PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. J Control Release 2006; 116(2): 123-9.
15. Bartlett DW, Davis ME. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from

live-cell and live-animal bioluminescent imaging. Nucleic Acids Res 2006; 34(1): 322-33.
16. Braasch DA, Paroo Z, Constantinescu A, Ren G, Oz OK, Mason RP, et al. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. Bioorg Med Chem Lett 2004; 14(5): 1139-43.
17. Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. RNA 2003; 9(9): 1034-48.
18. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature 2004; 432(7014): 173-8.
19. Tong AW, Jay CM, Senzer N, Maples PB, Nemunaitis J. Systemic therapeutic gene delivery for cancer: crafting Paris' arrow. Curr Gene Ther 2009; 9(1): 45-60.
20. Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, Szoka FC, Jr. Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. Biochim Biophys Acta 1998; 1390(2): 119-33.
21. Ogris M, Wagner E. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. Drug Discov Today 2002; 7(8): 479-85.
22. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. Adv Enzyme Regul 2001; 41: 189-207.
23. Sato A, Takagi M, Shimamoto A, Kawakami S, Hashida M. Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. Biomaterials 2007; 28(7): 1434-42.
24. Pichler A, Zelcer N, Prior JL, Kuil AJ, Piwnica-Worms D. In vivo RNA interference-mediated ablation of MDR1 P-glycoprotein. Clin Cancer Res 2005; 11(12): 4487-94.
25. Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, Satoh T, Ikeda M, Fukuoka M, et al. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin. Int J Cancer 2006; 118(4): 812-20.
26. Ning S, Fuessel S, Kotzsch M, Kraemer K, Kappler M, Schmidt U, et al. siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth. Int J Oncol 2004; 25(4): 1065-71.
27. Hornung V, Guenthner-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. Nat Med 2005; 11(3): 263-70.
28. Marques JT, Williams BR. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. Nat Biotechnol 2005; 23(11): 1399-405.
29. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol 2003; 21(6): 635-7.
30. Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, et al. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. Nucleic Acids Res 2005; 33(14): 4527-35.
31. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. RNA 2006; 12(7): 1197-205.
32. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(16): 7297-301.
33. Zelphati O, Szoka FC, Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(21): 11493-8.
34. Abrams MT, Koser ML, Seitzer J, Williams SC, DiPietro MA, Wang W, et al. Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment. Mol Ther 2010; 18(1): 171-80.
35. Li SD, Huang L. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. J Control Release 2010; 145(3): 178-81.
36. Laverman P, Carstens MG, Boerman OC, Dams ET, Oyen WJ, van RN, et al. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298(2): 607-12.
37. Koide H, Asai T, Hatanaka K, Urakami T, Ishii T, Kenjo E, et al. Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon. Int J Pharm 2008; 362(1-2): 197-200.
38. Howard KA. Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(9): 710-20.
39. Wu SY, McMillan NA. Lipidic systems for in vivo siRNA delivery. AAPS J 2009; 11(4): 639-52.
40. Li W, Szoka FC, Jr. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. Pharm Res 2007; 24(3): 438-49.
41. Lam JK, Liang W, Chan HK. Pulmonary

delivery of therapeutic siRNA. Adv Drug Deliv Rev 2012; 64(1): 1-15.
42. Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. Appl Biochem Biotechnol 2013; 169(6): 1774-89.
43. McNamara JO, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, et al. Cell type–specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. Nature Biotechnology 2006; 24: 1005-15.
44. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. Cancer Res 2005; 65: 8984.
45. Cui Y, Wang Q, Wang J, Dong Y, Luo C, Hu G, et al. Knockdown of AKT2 expression by RNA interference inhibits proliferation, enhances apoptosis, and increases chemosensitivity to the anticancer drug VM-26 in U87 glioma cells. Brain Res 2012; 1469: 1-9.
46. Zhang Z, Wang J, Shen B, Peng C, Zheng M. The ABCC4 gene is a promising target for pancreatic cancer therapy. Gene 2012; 491(2): 194-9.
47. Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(23): 8676-81.
48. Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, et al. Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. J Mol Med (Berl) 2008; 86(9): 987-97.
49. DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(19): 8800-5.
50. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. Nat Biotechnol 2003; 21(6): 639-44.
51. Martinez MA, Clotet B, Este JA. RNA interference of HIV replication. Trends Immunol 2002; 23(12): 559-61.
52. Ng EW, Adamis AP. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. Can J Ophthalmol 2005; 40(3): 352-68.
53. Zwicky R, Muntener K, Goldring MB, Baici A. Cathepsin B expression and down-regulation by gene silencing and antisense DNA in human chondrocytes. Biochem J 2002; 367(Pt 1): 209-17.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.11.2013
Vol. 32, No. 272, 1st Week, April 2014
Accepted: 11.02.2014

Bottlenecks in Clinical Application of siRNA Delivery Based on Non-Viral Vectors

Reza Ghavimi MSc[1], Meraj Pourhossein PhD[2]

Review Article

Abstract

In recent years, much more attentions have been focused on siRNA-based gene therapy. This approach is based on PTGS (Post-transcriptional gene silencing). Due to some defects in viral vectors, non-viral vectors have been used to deliver nucleic acids into target cells. Although, transfection efficiency in non-viral vectors is less than viral ones, but safety of non-viral vectors is much more. Characteristic features of siRNA, such as high compatibility, application in low doses and its versatility make it suitable in the gene therapy field. However, some challenges, such as stimulating immune system and Off-target silencing will be remain. In this review article, we express bottlenecks existing in siRNA delivery into target cells. According to the information, with further development of siRNA delivery in the future, it could be a promising approach in treatment for a variety of genetic diseases.

Keywords: siRNA delivery, Non viral vector, Gene therapy

Citation: Ghavimi R, Pourhossein M. **Bottlenecks in Clinical Application of siRNA Delivery Based on Non-Viral Vectors.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(272): 34-49

1- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Meraj Pourhossein PhD, Email: pourhossein@med.mui.ac.ir

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 prints out 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 in formations you can contact with JIMS office via E-mail address (jims@med.mui.ac.ir).

INSTRUCTION TO AUTHORS

1. **Aims and Scope:** The Journal of Isfahan Medical School is the official scientific **weekly** publication of the Faculty of Medicine in Isfahan Medical Sciences University.
   This Journal accepts Original Papers, Review Articles, Case Reports, Short Communications,Educational Medical Video Clips and Letters to the Editor on all aspects of medicine.
2. Manuscript **Submission is acceptable only via Journal URL: http://journals.mui.ac.ir/jims**
   Manuscript must be accompanied by a covering letter to the Editor-in-Chief, including title and author(s) name and undertaking that it has not been published or submitted elsewhere. In case the manuscript was earlier submitted to some other Journal and was rejected, the authors must provide full information for proper analysis. Manuscript should be typed in double space of the A-4 size paper with clear margins on both sides. The text should be submitted in Microsoft Word format only. Tables as well as illustrations should be typed and drawn on a separate pages. Do not submit tables as photographs.
   The figures should be sent in a format of JPEG or GIF which will produce high quality images in the online edition of the journal. Authors must declare that it is being exclusively contributed to the Journal of Isfahan Medical School.
3. The manuscript should include: **Title page**, the **Abstract** (in both Farsi and English), **Introduction**, **Materials & Methods**, **Results**, **Discussion**, **Acknowledgement and References**.
4. **The title page:** The complete title of the manuscript, the name of all the authors with their highest qualifications, the department or institution to which they are attached, address for correspondence with telephone numbers, e-mail, and Fax number.
5. The **Abstract:** All original articles must accompany a structured abstract up to 250 words. It should be structured as **Background**, **Methods**, **Results** and **Conclusion** followed by 3 **to** 5 **Keywords**. Keywords will assist indexers in cross indexing the article as they are published with abstract. Use terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of index medicus (http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html). Authors need to be careful that the abstract reflects the content of the article accurately.
6. **Introduction:** This should summarize the purpose and the rationale for the study. It should neither review the subject extensively nor should it have data or conclusions of the study.
7. **Materials & Methods:** This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is used, its manufacturer's name and address should be given in parenthesis. If the method is established, give reference but if the method is new, give enough information so that another author is able to perform it. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. For patients, age, sex with mean age ± 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 Esmaeil 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, Leuis 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 Barekatain** 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 Esmaeil 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 Ophtalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Marjane Foladi** PhD of Nursing, University of Flourida, 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. 272, 1st Week, April 2014

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible**: Mansour Sholehvar MD** Emerita Editor-in-Chief**: Roya Kelishadi MD**

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

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

Published by:
Isfahan University of Medical Sciences
E-mail: publications@mui.ac.ir

Office:
P.O. Box 81744-176, Isfahan, I.R. IRAN
Telefax: +98 311 7922291
E-mail: jims@med.mui.ac.ir
Website: http://www.journals.mui.ac.ir/jims
Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy edit, Layout edit, Design and Print:
Farzanegan Radandish Co.
P.O. Box 81465-1798, Isfahan, I.R. IRAN
Telefax: +98 311 6686302
E-mail: esfahanfarzanegan@yahoo.com
f.radandish@gmail.com
www.farzaneganco.ir
Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexers

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

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

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