دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Isfahan University of Medical Sciences and Health Services

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

هفته‌نامه

سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/ هفته سوم مهر ۱۳۹۳

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

Weekly Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014

مقاله‌های پژوهشی

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی در استان اصفهان ۱۳۲۹
دکتر سید اصغر هوایی، دکتر بهرام نصر اصفهانی، نفیسه سادات حسینی، بهناز اسدبیگی

بررسی جهش‌های ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمیک مغلوب استان هرمزگان با استفاده از روش‌های PCR-SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA ۱۳۳۰
شهربانو پرچمی برجوئی، سمیه رئیسی، فاطمه رضائیان، فاطمه هیبتی، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری

اثرات عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رشد رده‌های سلول‌های سرطانی HT-۲۹ و CT-۲۶ ..... ۱۳۳۸
سهیلا خضرایی مرادیان، دکتر علیرضا عندلیب، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی، زهره سفری، احد زارع، دکتر غلامعلی کاردر

بررسی منابع مختلف آب شهر اصفهان از نظر آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش مولکولی Fluorescent nested polymerase chain reaction ۱۳۴۷
دکتر فرح تاج نواب اکبر، دکتر رسول صالحی

مقاله کوتاه

اثر امواج الکترومغناطیسی پیوسته با فرکانس پایین بر غلظت متابولیت سروتونین تولید شده در هسته‌ی رافه‌ی مغز موش های صحرایی بالغ ۱۳۵۴
دکتر داریوش شهبازی، لیلا شیری، دکتر حجت‌اله علایی، دکتر ناصر نقدی، دکتر سعید کرمانی، حسین افروزی، علی کیانی، مجتبی اکبری

Original Articles

Investigation of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of Methicillin-Resistant Strains (MRSA) in Staphylococcus Aureus Isolates Associated with Bovine Mastitis 1329
Sayed Asghar Havaei PhD, Bahram Nasr Esfahani PhD, Nafisehsadat Hoseini MSc, Behnaz Assadbeigi

Screening LRTOMT Gene (DFNB63 locus) in Patients with Recessive Nonsyndromic Hearing Loss in Hormozgan Province, Iran 1337
Shahrbanoo Parchami-Barjui MSc, Somayeh Reiisi MSc, Fatemeh Rezaiean, Fatemeh Heybati, Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD

The Effect of Protein Extract of Licorice Root in Proliferation of HT-29 and CT Cancer Cell Lines 1346
Soheila Khazraei-Moradian MSc, Alireza Andalib PhD, Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD, Zohreh Safari, Ahad Zare, Gholam Ali Kardar PhD

Evaluation of Various Water Resources in Isfahan, Iran, for the Presence of Helicobacter Pylori Using Fluorescent Nested Polymerase Chain Reaction 1353
Farah Taj Navab-Akbar PhD, Rasoul Salehi PhD

Short Communication

The Effect of Extremely Low-Frequency Magnetic Fields on the Level of Serotonin Metabolite in the Raphe Nuclei of Adult Male Rat 1362
Daryoush Shahbazi PhD, Leila Shiri, Hojatollah Alaei PhD, Naser Naghdi PhD, Saeid Kermani PhD, Hossein Afrouzi MSc, Ali Kiani MSc, Mojtaba Akbari MSc

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۹۸)، هفته سوم مهر 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

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی در استان اصفهان.....۱۳۱۹

دکتر سید اصغر هوایی، دکتر بهرام نصر اصفهانی، نفیسه سادات حسینی، بهناز اسدبیگی

بررسی جهش‌های ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمیک مغلوب استان هرمزگان با استفاده از روش‌های PCR-SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA.....۱۳۳۰

شهربانو پرچمی برجوئی، سمیه رئیسی، فاطمه رضائیان، فاطمه هیبتی، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری

اثرات عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رشد رده‌های سلول‌های سرطانی HT-۲۹ و CT-۲۶.....۱۳۳۸

سهیلا خضرایی مرادیان، دکتر علیرضا عندلیب، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی، زهره سفری، احد زارع، دکتر غلامعلی کاردر

بررسی منابع مختلف آب شهر اصفهان از نظر آلودگی به هلیکوباکترپیلوری با استفاده از روش مولکولی Fluorescent nested polymerase chain reaction.....۱۳۴۷

دکتر فرح تاج نواب اکبر، دکتر رسول صالحی

مقاله کوتاه

اثر امواج الکترومغناطیسی پیوسته با فرکانس پایین بر غلظت متابولیت سروتونین تولید شده در هسته‌ی رافه‌ی مغز موش‌های صحرایی بالغ.....۱۳۵۴

دکتر داریوش شهبازی، لیلا شیری، دکتر حجت‌اله علایی، دکتر ناصر نقدی، دکتر سعید کرمانی، حسین افروزی، علی کیانی، مجتبی اکبری

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۱۷

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی در استان اصفهان

دکتر سید اصغر هوایی[۱]، دکتر بهرام نصر اصفهانی[۱]، نفیسه سادات حسینی[۲]، بهناز اسدبیگی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی ایجاد ورم پستان گاوی است. مقاومت برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص متی‌سیلین، درمان عفونت ناشی از آن را با مشکلات بسیاری مواجه کرده است. همچنین انتقال سویه‌های مقاوم به انسان نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. از این رو، هدف این مطالعه، بررسی میزان شیوع ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در گاوداری‌های استان اصفهان و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این ایزوله‌ها بود.

روش‌ها: تعداد ۴۵۰ نمونه‌ی شیر جمع‌آوری شد. پس از تلقیح و انجام آزمون‌های مربوط، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده، با روش انتشار دیسک بررسی گردید. آزمون D-test (Double disk diffusion test) جهت ردیابی مقاومت القایی کلیندامایسین (ICR یا Inducible clindamycin resistance) صورت گرفت. سپس سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA یا Methicillin-resistant staphylococcus aureus) با استفاده از دو روش اگزاسیلین آگار اسکرین و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن ردیابی شدند.

یافته‌ها: تعداد ۵۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی گردید. تمامی ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین حساس بودند. تعداد ۳۱، ۲۵، ۸، ۷ و ۲ ایزوله به ترتیب نسبت به اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین و کوتریموکسازول مقاوم بودند. D-test برای تمامی سویه‌ها منفی بود. ۹ سویه‌ی MRSA با استفاده از روش اگزاسیلین آگار اسکرین و ۱۰ سویه‌ی MRSA با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: از آن جا که انتظار می‌رود شیوع استافیلوکوکوس اورئوس، به خصوص سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گاوداری‌ها، بسیار ناچیز باشد، حتی درصد شیوع پایین گزارش شده نیز، مشکلات زیادی به دنبال خواهد داشت. بنابراین انجام یک آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی مناسب، قبل از شروع درمان آنتی‌بیوتیکی در موارد ورم پستان گاوی، حایز اهمیت است.

واژگان کلیدی: ورم پستان گاوی، استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، Methicillin-resistant staphylococcus aureus

ارجاع: هوایی سید اصغر، نصر اصفهانی بهرام، حسینی نفیسه سادات، اسدبیگی بهناز. **بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی در استان اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ۱۳۲۹-۱۳۱۹

۱- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- کارشناس ارشد،گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: بهناز اسدبیگی
Email: beh69766@yahoo.com

مقدمه

ماستیتیس یا ورم پستان، به التهاب غده‌ی پستانی اطلاق می‌شود. واژه‌ی ورم پستان از کلمه‌ی یونانی Mastos به معنی پستان و Itis به معنی التهاب تشکیل شده است. این التهاب می‌تواند بر اثر ضربه یا صدمه‌ی فیزیکی به پستان، تحریک‌های شیمیایی و عفونت ایجاد شده به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌ها ایجاد شود که مورد آخر از متداول‌ترین انواع ورم پستان به شمار می‌رود (۳-۱). ورم پستان گاوی به عنوان یکی از پر هزینه‌ترین بیماری‌های گاو شیری در سرتا سر جهان مطرح است و سبب کاهش کیفیت و کمیت شیر تولیدی، افزایش هزینه‌های درمانی و خدمات دامپزشکی، افزایش سقط جنین و کاهش باروری در گاو می‌شود و در موارد شدید، منجر به حذف دام مبتلا به بیماری خواهد شد (۵-۴).

ورم پستان را از نظر علایم بالینی می‌توان به دو دسته‌ی عمده‌ی تحت بالینی (Subclinical) و بالینی (Clinical) تقسیم کرد (۶، ۱). بر خلاف حالت بالینی که با تغییرات غیر طبیعی قابل مشاهده‌ای مانند تورم، قرمزی و گرمی در پستان و نیز حضور لخته، رگه و ترشحات غیر معمول داخل شیر همراه است، در ورم پستان تحت بالینی، شیر و پستان گاو، هر دو در ظاهر طبیعی به نظر می‌رسند؛ اما میزان لکوسیت‌های شیر (سلول‌های سوماتیک شیر) افزایش می‌یابد و عوامل پاتوژن در غده‌ی شیری حضور دارند. این نوع ورم پستان را می‌توان به وسیله‌ی آزمایش‌های مختلف، که برای پی بردن به حضور میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود، و یا به وسیله‌ی شمارش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر Scc (Somatic cells count) تشخیص داد (۸-۷، ۱).

میکروارگانیسم‌های عمده در بروز ورم پستان به دو دسته‌ی اصلی، واگیردار (Contagious) و محیطی (Environmental) تقسیم می‌شوند. عوامل واگیردار از پستان آلوده به پستان غیر آلوده و گاوهای سالم سرایت می‌کنند، منبع اصلی آن‌ها غده‌ی شیری آلوده است و سبب افزایش Scc به بیش از ۴۰۰۰۰۰ در میلی‌لیتر می‌شوند. یکی از شایع‌ترین عوامل واگیردار ورم پستان، استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱۰-۹، ۴). بیشتر عفونت‌های داخل پستانی که در اثر استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می‌شوند، تحت بالینی هستند و در نتیجه، درمان این بیماری به موقع انجام نمی‌شود. عدم تشخیص به موقع و تأخیر درمان در چنین مواردی، منجر به پیشرفت بیماری و ایجاد ماستیتیت چرکی (Suppurative) حاد، گانگرونوز و مزمن خواهد شد که اغلب موارد، مرگ و حذف دام آلوده را در پی دارد (۱۲-۱۱).

از طرف دیگر، مقاومت برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص متی‌سیلین، درمان عفونت ناشی از آن را با مشکلات بسیاری مواجه می‌کند، سبب افزایش بروز بیماری، طول دوره و هزینه‌ی درمان می‌شود که اغلب منجر به مرگ دام مبتلا خواهد شد. علاوه بر خسارات اقتصادی، مسأله‌ی بهداشت عمومی و انتقال سویه‌های مقاوم به انسان نیز از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۳، ۹).

حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA یا Methicillin-resistant staphylococcus aureus) مرتبط با ورم پستان برای اولین بار طی سال‌های ۷۵-۱۹۷۲، در بلژیک گزارش شد (۱۵-۱۴). به

تازگی، یک کلون اختصاصی MRSA، CC۳۹۸ (Clonal complex۳۹۸)، که مرتبط با خوک‌ها، گوساله‌ها، جوجه‌ها، حیوانات خانگی و انسان‌های دارای تماس نزدیک با حیوانات است، مشاهده شده است. MRSA از این نوع را MRSA مرتبط با احشام یا LA-MRSA (Livestock-associated methicillin resistance Staphylococcus aureus) می‌گویند (۱۳). ظهور MRSA در گاوهای شیری ممکن است در اثر تماس با دیگر گونه‌ها، برای مثال CC۳۹۸ و یا در اثر تبادل مواد ژنتیکی بین استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی باشد که این استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی، یکی از رایج‌ترین گونه‌های مرتبط با عفونت داخل پستانی گاوی هستند و به طور معمول عوامل تعیین کننده‌ی مقاومت ضد میکروبی را حمل می‌کنند (۹).

بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در گاوداری‌های استان اصفهان، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت القایی کلیندامایسین (ICR یا Inducible clindamycin resistance) در این ایزوله‌ها و بررسی فراوانی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) عامل ماستیتیت گاوی با استفاده از دو روش اگزاسیلین آگار اسکرین و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن بود.

روش‌ها

تشخیص ورم پستان در گاوهای شیری

ورم پستان بالینی با مشاهده‌ی تغییرات غیر طبیعی در شیر مانند تغییر رنگ، وجود لخته و نیز تورم، گرمی، درد و قرمزی در حداقل یکی از چهار کارتیه (Quarter) پستان، تشخیص داده شد (۱۶-۱۵، ۲). جهت تشخیص ورم پستان تحت بالینی، از آزمون غیر مستقیم کالیفرنیا ماستیتیس (CMT یا California mastitis test) استفاده شد که جهت شمارش سلول‌های سوماتیک شیر به کار می‌رود. برای انجام این آزمون، ابتدا کارتیه‌ی مورد نظر شستشو و ضد عفونی شد. در مرحله‌ی بعدی، دوشش اولیه دور ریخته شد و مقدار ۲ ml از شیر کارتیه در پلیت مخصوص CMT دوشیده و سپس ۲ ml از محلول شیرآزما به آن افزوده شد و به صورت ملایم چرخش داده شد تا مخلوط شود. سپس نمونه‌ی شیر مورد نظر، از نظر تشکیل رسوب، لخته و یا دلمه مورد بررسی قرار گرفت (۱۸-۱۷).

نتایج واکنش به صورت منفی (بدون هیچ گونه واکنشی)، ضعیف (در طول چرخاندن مخلوط رگه‌هایی قابل مشاهده هستند)، یک مثبت (غلیظ شدن شیر طی چرخش بدون تشکیل دلمه یا ژل)، دو مثبت (تشکیل ضعیف دلمه و ژل و برقراری جریان بسیار آرام طی چرخش در سطح پلیت) و سه مثبت (تشکیل دلمه و ژل جامد چسبیده به بستر پلیت مخصوص) تفسیر شد (۷). کارتیه‌هایی که CMT برابر یک مثبت یا بالاتر داشتند، به عنوان کارتیه‌ی عفونی در نظر گرفته شدند (۱۸، ۱۲، ۷).

جمع‌آوری نمونه‌های شیر

در این مطالعه، تعداد ۴۵۰ نمونه‌ی شیر از گاوهای آلوده به ورم پستان موجود در گاوداری‌های صنعتی استان اصفهان جمع‌آوری گردید. از این میان، ۱۶۰ نمونه مربوط به ورم پستان بالینی و ۲۹۰ نمونه مرتبط با ورم پستان تحت بالینی بودند. جهت

جمع‌آوری نمونه‌های شیر مورد نظر، ابتدا کارتیه‌ی مورد نظر با آب تمیز شستشو شد و بعد از خشک شدن، انتهای هر کارتیه در محل منفذ با پنبه‌ی آغشته به الکل اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی گردید. پس از دور ریختن سه دوشش اولیه، مقدار ml ۱۰ شیر، داخل لوله‌ی استریل جمع‌آوری گردید (۱۹). نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده داخل ظرف یخ قرار گرفت و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری شدند (۱۲، ۷).

کشت نمونه‌های شیر و جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

جهت جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس، مقدار ml ۱ از هر نمونه‌ی شیر منجمد بعد از ذوب شدن در دمای محیط بر روی محیط Baird- Parker agar تلقیح شد. بعد از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در ^{o}C ۳۷، کلنی‌های مشکوک که به شکل کلنی‌های سیاه رنگ و مدور همراه با هاله‌ی شفاف در اطرافشان بودند، بر روی محیط Blood agar ساب کالچر داده شدند و دوباره به مدت ۲۴ ساعت در ^{o}C ۳۷ انکوبه گردیدند (۲۰).

تشخیص قطعی استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس مورفولوژی کلنی‌ها روی محیط Blood agar، ایجاد همولیز بتا، مشاهده‌ی کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای در زیر میکروسکوپ پس از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، کواگولاز لوله‌ای و DNase (Deoxyribonuclease) مثبت صورت گرفت. برای نگهداری نمونه‌ها، محیط مایع تریپتیکاز سوی براث (TSB یا Tryptic soy broth) و یا انفوزیون قلب مغز (BHI یا Brain heart infusion) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول به عنوان نگهدارنده به کار رفت و سپس نمونه‌ها در فریزر با دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری شدند (۲۱، ۱۸).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک

سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland از کشت ۲۴-۱۸ ساعته‌ی باکتری تهیه و روی سطح محیط Mueller-Hinton آگار به صورت یکنواخت و چمنی کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (سیپروفلوکساسین و جنتامایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین و کوتریموکسازول) روی محیط قرار گرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ^{o}C ۳۵ انکوبه شدند و پس از این مدت، قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری و تفسیر گردید. سه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم مشخص شد. لازم به ذکر است که از سویه‌ی استاندارد ATCC۲۵۹۲۹ به عنوان شاهد کیفی استفاده شد (۲۱).

انجام D-test جهت تعیین مقاومت القایی کلیندامایسین (ICR)

D-test (Double disk diffusion test) جهت تعیین مقاومت القایی کلیندامایسین در ایزوله‌های مقاوم به اریترومایسین و حساس به کلیندامایسین صورت گرفت. در این آزمون نیز سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland از کلنی باکتری همانند روش دیسک دیفیوژن تهیه و روی محیط Mueller-Hinton آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های کلیندامایسین و اریترومایسین با فاصله‌ی ml ۲۰-۱۵ از هم بر روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ^{o}C ۳۵ انکوبه شدند. ایجاد یک

هاله‌ی D شکل در اطراف دیسک کلیندامایسین، به عنوان نتیجه‌ی مثبت در نظر گرفته شد (۲۲).

تعیین مقاومت نسبت به متی‌سیلین با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن

به این منظور، مطابق با پروتکل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، از کشت ۲۴ ساعته و تازه‌ی باکتری، سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland تهیه و با استفاده از سواپ استریل بر روی محیط Mueller-Hinton آگار به صورت یکنواخت تلقیح شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، دیسک‌های سفوکسیتین (Rosco ۳۰ µg) با استفاده از یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۵ ^{o}C انکوبه و سپس قطر هاله‌های عدم رشد بررسی شد. قطر هاله معادل با ≤ ۲۲ به عنوان مقاوم به متی‌سیلین، ۱۷-۱۵ به عنوان میانه و ≥ ۲۱ به عنوان حساس گزارش شد. از سویه‌ی ATCC۲۵۹۲۳ به عنوان شاهد منفی و از سویه‌ی ATCC۳۳۵۹۱ به عنوان شاهد مثبت استفاده شد (۲۴-۲۳).

تعیین مقاومت نسبت به متی‌سیلین با روش آگار اسکرین

در این روش از محیط کشت Mueller-Hinton آگار حاوی ۴ درصد NaCl و ۶ µg/ml پودر اگزاسیلین استفاده شد. جهت محاسبه‌ی میزان پودر اگزاسیلین مورد نیاز برای تهیه‌ی محیط، از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\text{Weight(mg)} = \frac{\text{volume(ml)} \times \text{concentration}(\frac{\mu g}{ml})}{\text{potency}(\mu g/mg)}$$

از سوسپانسیون معادل با ۰/۵ McFarland که از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری تهیه شده بود، به صورت نقطه‌ای روی محیط‌ها تلقیح شد. سپس پلیت‌ها در ۳۵ ^{o}C قرار گرفتند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، هر گونه رشدی در محل تلقیح به عنوان مقاومت در نظر گرفته شد. در این روش نیز مانند روش دیسک دیفیوژن، از سویه‌های ATCC۲۵۹۲۳ و ATCC۳۳۵۹۱ به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده گردید (۲۵، ۲۱).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC یا Minimum inhibition concentration) اگزاسیلین

حداقل غلظت مهار کنندگی با استفاده از روش آگار Dilution ، برای نمونه‌هایی که در روش اگزاسیلین آگار اسکرین، مقاوم گزارش شدند، تعیین گردید. به این منظور، محیط‌های Mueller-Hinton آگار دارای ۴ درصد NaCl حاوی غلظت‌های متوالی از اگزاسیلین شامل ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ µg/ml تهیه شد. در این روش نیز از فرمول ذکر شده در روش آگار اسکرین، جهت تعیین میزان پودر اگزاسیلین استفاده شد.

از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری، سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland تهیه و به میزان ۰/۱ رقیق شد تا به غلظت ۱۰۷ CFU/ml رسید. سپس با غلظت نهایی ۱۰۴ CFU/ml در هر قطره، به صورت نقطه‌ای در پلیت‌ها تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ ^{o}C قرار گرفتند و بعد از گذشت این مدت زمان، اولین غلظتی از اگزاسیلین که هیچ گونه رشدی روی آن صورت نگرفته بود، به عنوان MIC اگزاسیلین برای سویه‌ی مورد نظر گزارش گردید.

طبق دستورالعمل CLSI، پایین‌ترین میزان MIC اگزاسیلین برای سویه‌های MRSA، بیشتر از

۴ µg/ml و بالاترین میزان MIC نیز بیشتر از ۲۵۶ µg/ml در نظر گرفته شد (۲۷-۲۶).

یافته‌ها

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های شیر

در مطالعه‌ی حاضر که بر روی نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از ۲۹۰ رأس گاو آلوده به ورم پستان تحت بالینی و ۱۶۰ رأس گاو مبتلا به ورم پستان بالینی صورت گرفت، تعداد ۵۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۱۲ درصد) جداسازی شد. از این میان، ۴۵ (۱۵/۵۱ درصد) ایزوله مربوط به ورم پستان تحت بالینی و ۹ ایزوله (۵/۶۲ درصد) مربوط به ورم پستان بالینی بودند (جدول ۱).

جدول ۱. تعداد و درصد ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های شیر مربوط به ورم پستان بالینی و تحت بالینی

نوع ورم پستان	تعداد نمونه‌ی شیر	تعداد ایزوله‌ها (درصد)
بالینی	۱۶۰	۹ (۵/۶۲)
تحت بالینی	۲۹۰	۴۵ (۱۵/۵۱)
کلیه‌ی حالات	۴۵۰	۵۴ (۱۲/۰۰)

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی و D-test

تمامی ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین حساس بودند. تعداد ۳۱ (۵۷/۴ درصد)، ۲۵ (۴۶/۲۹ درصد)، ۸ (۱۴/۸۱ درصد)، ۷ (۱۲/۹۶ درصد) و ۲ (۳/۷۱ درصد) از ایزوله‌ها به ترتیب نسبت به اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین و کوتریموکسازول مقاوم بودند (جدول ۲). D-test برای تمامی سویه‌ها منفی بود.

نتایج روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن

در این روش، از تعداد ۵۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده در این مطالعه، ۱۰ ایزوله (۱۸/۵۱ درصد) به عنوان مقاوم به متی‌سیلین یا MRSA تشخیص داده شدند. از این میان، ۱ (۱۱/۱۱ درصد) ایزوله مربوط به ورم پستان بالینی و ۹ (۲۰/۰۰ درصد) ایزوله با ورم پستان تحت بالینی مرتبط بودند.

نتایج روش اگزاسیلین آگار اسکرین

تعداد MRSAهای شناسایی شده در این روش برابر با ۹ (۱۶/۶۷ درصد) سویه بود. از این میان، ۱ مورد (۱۱/۱۱ درصد) مرتبط با ایزوله‌های جداسازی شده از ورم پستان بالینی و ۸ مورد دیگر (۱۷/۷۸ درصد) مربوط به ایزوله‌های جدا شده از ورم پستان تحت بالینی بودند.

نتایج MIC به روش آگار Dilution

از میان ۹ ایزوله‌ی مقاوم به متی‌سیلین که در روش اگزاسیلین آگار اسکرین تعیین شده بودند، MIC اگزاسیلین برای ۷ مورد از نمونه‌ها، ۱۲۸ µg/ml و برای ۲ ایزوله‌ی دیگر، ۲۵۶ µg/ml بود (جدول ۳).

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی در ایجاد ماستیتیت واگیردار است (۱۰-۹، ۴). منبع اصلی عفونت در این موارد، پستان گاوهای آلوده است که ارگانیسم‌ها را از طریق دست شیردوشان، وسایل شیردوشی و محیط نگهداری گاوها، انتقال می‌دهد.

احتمال می‌رود شیوع بالای استافیلوکوکوس اورئوس در موارد ورم پستان، به پراکندگی گسترده‌ی ارگانیسم درون غدد شیری گاو و روی پوست

جدول ۲. نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آنتی‌بیوتیک تعداد و درصد ایزوله‌ها	اریترومایسین	کلیندامایسین	تتراسایکلین	اگزاسیلین	کوتریموکسازول	سیپروفلوکساسین	جنتامایسین
مقاوم	۳۱ (۵۷/۴۰)	۲۵ (۴۶/۲۹)	۸ (۱۴/۸۱)	۷ (۱۲/۹۶)	۲ (۳/۷۱)	۰ (۰)	۰ (۰)
حساس	۲۳ (۴۲/۶۰)	۲۹ (۵۳/۷۰)	۴۶ (۸۵/۱۸)	۴۷ (۸۷/۰۳)	۵۲ (۹۶/۲۹)	۵۴ (۱۰۰)	۵۴ (۱۰۰)

جدول ۳. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) اگزاسیلین برای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در روش اگزاسیلین آگار اسکرین

MIC (µg/ml)	تعداد سویه‌ها (درصد)
۱۲۸	۷ (۷۷/۷۸)
۲۵۶	۲ (۲۲/۲۲)

MIC: Minimum inhibition concentration

ناحیه‌ی سر پستان، وابسته باشد. استافیلوکوکوس اورئوس به خوبی با زنده ماندن در درون غدد شیری گاو تطابق می‌یابد و می‌تواند ورم پستان مزمن و تحت بالینی ایجاد کند. این ارگانیسم، درون شیر دفع می‌شود و به عنوان منبع عفونت برای گاوهای سالم طی شیردوشی عمل می‌کند (۱۶).

با توجه به نتایج این مطالعه، از تعداد ۴۵۰ نمونه‌ی شیر جمع‌آوری شده، ۵۴ (۱۲ درصد) ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد که حاکی از شیوع پایین ورم پستان گاوی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در منطقه‌ی مورد مطالعه است. این نتایج، تأیید کننده‌ی یافته‌های حاصل از مطالعه‌ی ابراهیمی و اخوان طاهری در شهرکرد می‌باشد؛ به طوری که در مطالعه‌ی وی، تنها ۸ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۸/۱۶ درصد) از تعداد ۹۸ نمونه‌ی شیر جداسازی شد (۲۰).

در مطالعه‌ی خان‌ناظر و سرمدی در شیراز نیز از تعداد ۱۳۵۲ نمونه‌ی شیر دریافتی از ورم پستان، ۱۱۸ (۸/۷۳ درصد) ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد (۲۷). Busato و همکاران، مطالعه‌ای بر روی ۱۹۰۷ گاو شیری مبتلا به ورم پستان در کشور سوئیس انجام دادند. طبق نتایج مطالعه‌ی آن‌ها، میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس ۱۱/۷ درصد بود (۲۸). Phuektes و همکاران نیز ۱۱۷ نمونه‌ی شیر مرتبط با عفونت تحت بالینی ورم پستان را در استرالیا بررسی و ۷ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۵/۹۹ درصد) را جداسازی کردند (۲۹).

همچنین طبق مطالعه‌ی اطیابی و همکاران، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در موارد ورم پستان گاوی در ایران بسیار پایین بود و از تعداد ۲۹۰۴ نمونه‌ی شیر جمع‌آوری شده، تنها ۸۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۲/۸۹ درصد) جداسازی گردید (۱۱).

بررسی‌ها نشان داده است که درصد بالایی از عفونت‌های داخل پستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، تحت بالینی می‌باشند (۱۲). مانند بسیاری از مطالعات دیگر، در این مطالعه نیز بیشترین تعداد استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده، مربوط به شکل تحت بالینی ورم پستان بود؛ به طوری که از تعداد کل ۵۴ ایزوله، ۴۵ مورد (۱۵/۵۲ درصد) مرتبط با ۲۹۰ نمونه‌ی شیر دریافتی از ورم پستان تحت بالینی بودند. این در حالی است که تنها ۹ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۵/۶۲ درصد)، از تعداد ۱۶۰ نمونه‌ی شیر مربوط به ورم پستان بالینی جداسازی شد.

همچنین مطالعه‌ی Abera و همکاران در اتیوپی نیز این نتایج را تأیید می‌کند؛ به طوری که در مطالعه‌ی وی، ۱۰ ایزوله‌ی (۳۳/۳ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس از تعداد ۳۰ نمونه‌ی شیر مربوط به ورم پستان بالینی و ۴۹ ایزوله (۴۴/۵ درصد) از تعداد ۱۱۰ نمونه‌ی مرتبط با ورم پستان تحت بالینی، جداسازی شد. طبق نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها در مطالعه‌ی Abera و همکاران، تمامی ایزوله‌ها نسبت به جنتامایسین، کلرامفنیکل، کانامایسین و پلی‌میکسین B، حساس بودند. تعداد ۳۴ ایزوله (۹۴/۴ درصد)، ۲۱ (۵۸/۳ درصد)، ۱۳ (۳۶/۱ درصد)، ۹ (۲۵/۰ درصد) و ۲ (۵/۶ درصد) به ترتیب نسبت به پنی‌سیلین، کوتریموکسازول، آموکسی‌سیلین، مینوسیکلین و استرپتومایسین مقاوم بودند (۱۷).

مسأله‌ی حایز اهمیت دیگر در موارد ورم پستان گاوی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت برخی سویه‌ها به متی‌سیلین و سایر داروهای بتالاکتام است که درمان عفونت ناشی از آن را با مشکلات بسیاری مواجه می‌کند و احتمال انتقال این سویه‌های مقاوم را به جوامع انسانی افزایش می‌دهد (۱۳، ۹). حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) مرتبط با ورم پستان برای اولین بار توسط Devriese و همکاران طی سال‌های ۷۵-۱۹۷۲، با استفاده از روش‌های فنوتیپی در بلژیک گزارش شد (۱۵-۱۴).

در مطالعه‌ی حاضر دو روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و اگزاسیلین آگار اسکرین به منظور تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به کار گرفته شد. با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، تعداد ۱۰ ایزوله‌ی MRSA (۱۸/۵۲ درصد شامل ۹ سویه‌ی مربوط به موارد تحت بالینی و ۱ سویه‌ی مربوط به موارد بالینی ورم پستان) و با روش اگزاسیلین آگار اسکرین، تعداد ۹ ایزوله‌ی MRSA (۱۶/۶۶ درصد شامل ۸ سویه‌ی مربوط به ورم پستان تحت بالینی و ۱ سویه‌ی مربوط به ورم پستان بالینی) شناسایی شد. این نتایج با گزارش‌های ارایه شده توسط Turkyilmaz و همکاران در ترکیه مطابقت داشت؛ چرا که در مطالعه‌ی ایشان، از تعداد ۹۳ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی، ۱۶ سویه‌ی MRSA (۱۷/۲ درصد) جداسازی شد (۳۰).

مطالعات اخیر نشان داده است که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، نسبت به دیگر روش‌های فنوتیپی نظیر اگزاسیلین آگار اسکرین، برتری دارد و در حال حاضر به عنوان یک روش مناسب جهت تعیین سویه‌های MRSA در بسیاری از مراجع از جمله CLSI پذیرفته شده است (۳۱). با این وجود، استفاده از روش اگزاسیلین آگار اسکرین، به خاطر سهولت انجام و هزینه‌ی پایین‌تر، در آزمایشگاه‌ها ترجیح داده می‌شود (۳۲).

از آن جا که انتظار می‌رود با رعایت مسایل بهداشتی و کنترل آلودگی در گاوداری‌ها، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس به خصوص سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، بسیار پایین باشد، حتی درصد شیوع ناچیز گزارش شده در مطالعه‌ی حاضر نیز، مشکلات زیادی به دنبال خواهد داشت؛ چرا که احتمال انتقال و سرایت این ارگانیسم‌ها به دیگر گاوها، افراد در تماس نزدیک با دام و به دنبال آن کل جمعیت انسانی وجود دارد.

همچنین عفونت با این سویه‌های مقاوم، درمان دام‌های آلوده را با مشکل مواجه می‌کند، سبب افزایش هزینه‌های درمانی و مرگ و میر دام خواهد شد و خسارات اقتصادی بالایی به صنعت لبنیات کشور وارد می‌کند. به نظر می‌رسد این مقاومت، ناشی از مصرف بی‌رویه، نامناسب و طولانی مدت آنتی‌بیوتیک مورد نظر باشد. بنابراین انجام یک آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی مناسب، قبل از شروع درمان آنتی‌بیوتیکی در موارد ورم پستان گاوی، بسیار حایز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد بهناز اسد بیگی به شماره‌ی ۳۹۲۲۰۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. بدین وسیله از کارکنان محترم گاوداری های فوکا، نصر و فضیل استان اصفهان و کارکنان و مدیر محترم گروه میکروب‌شناسی دانشکده ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Philpot WN, Nickerson SC. Winning the fight against mastitis. Naperville, IL: Westfalia Surge; 2000.
2. Saleki K, Moradi H. Bacterial agents of mastitis in dairy cow farms in Ilam city. J Ilam Univ Med Sci 2013; 20(4): 88-95. [In Persian].
3. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2011; 16(4): 383-407.
4. Schroeder JW. Bovine mastitis and milking management [Online]. [cited 2010]; Available from: URL:http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129.pdf
5. Barker AR, Schrick FN, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. J Dairy Sci 1998; 81(5): 1285-90.
6. Risco CA, Donovan GA, Hernandez J. Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. J Dairy Sci 1999; 82(8): 1684-9.
7. Hashemi M, Kafi M, Safdarian M. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. Iran J Vet Res 2011; 12(3): 236-41.
8. Nava H, Tajik P. Evaluation of two screening test, CMT and ECT to detect subclinical mastitis in dairy cow. J Fac Vet Med Univ Tehran 2002; 57(4):91-6.
9. Holmes MA, Zadoks RN. Methicillin resistant S. aureus in human and bovine mastitis. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2011; 16(4): 373-82.
10. Kazemi J, Ahmadi M, Dastmalchi Saei H, Adib Hesami M. The effect of silver nanoparticles and beta-lactam antibiotics individually and in combination on Staphylococcus aureus isolated from cattle mastitis. Vet Microbiol 2012; 8(1): 57-66.
11. Atyabi N, Vodjgani M, Gharagozloo F, Bahonar A. Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Tehran. Iran J Vet Res 2006; 7(3): 76-9.
12. Ghorbanpoor M, Seyfiabad Shapouri M, Moatamedi H, Jamshidian M, Gooraninejad S. Comparison of PCR and bacterial culture methods for diagnosis of dairy cattle's subclinical mastitis caused by Staphylococcus aureus. J Vet Res 2007; 62(4): 87-91.
13. Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Vet Microbiol 2010; 144(1-2): 166-71.
14. Devriese LA, Hommez J. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dairy herds. Res Vet Sci 1975; 19(1): 23-7.
15. Devriese LA, Van Damme LR, Fameree L. Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases. Zentralbl Veterinarmed B 1972; 19(7): 598-605.
16. Mohammad Sadegh M, Askari Badouei M, Gorjidooz M, Daneshvar M and Koochakzadeh A. A study on the clinical Coliform mastitis of Holstein cows on Garmsar suburban dairy farms. Vet Microbiol 2012; 8(2): 137-49.
17. Abera M, Demie B, Aragaw K, Regassa F, Regassa A. Isolation and identification of

Staphylococcus aureus from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. J Vet Med Anim Health 2010; 2(3): 29-34.

18. Vojgani M, Gharagozloo F, Bahonar A, Darabi M, Jafari H. Evaluation of therapeutic effects of topical application of eucalyptus essential oil (essence) on experimental mastitis caused by Streptococcus agalactiae. Iran Vet J 2006; 10(12): 5-14. [In Persian].

19. Ghorbanpoor M, Seifiabad Shapouri M, Moatamedi H, Jamshidian M, Gooraninejad S. Comparison of microbial culture, PCR and CMT for diagnosis of dairy cattle's staphylococcal and streptococcal subclinical mastitis. Iran Vet J 2007; 3(1): 63-70.

20. Ebrahimi A, Akhavan Taheri M. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord. Iran J Vet Res 2009; 10(3): 273-7.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard (M02-A11.). 11th ed [Online]. [cited 2012]; Available from: URL: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/01-CLSI-M02-A11-2012.pdf.

22. Sedighi I, Rasoul Yousefi M, Pak N, Seif Rabiee MA. D-test method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococcus aureus. Iran J Pediatr 2009; 19(3): 293-7.

23. Ghasemian Safai H, Rahimi E. Detection of classical enterotoxins of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. Vet Microbiol 2010; 141(3-4): 393–4.

24. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for mecA gene for detection of MRSA. Indian J Med Microbiol 2009; 27(1): 27-9.

25. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, Sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. J Arak Univ Med Sci 2013; 16(71): 29-37. [In Persian].

26. Caierao J, Superti S, Dias CA, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(3): 277-80.

27. Khan Nazer A. H, Sarmadi R. Prevalence of clinical and subclinical mastitis, antibiotic resistance and determination of minimum inhibitory Concentration (MIC) in Staphylococcus aureus and Escherichia coli isolated from cases of bovine Mastitis. J Vet Res 2005; 60(3): 247-52.

28. Busato A, Trachsel P, Schallibaum M, Blum JW. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. Prev Vet Med 2000; 44(3-4): 205-20.

29. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus and streptococcal causes of bovine mastitis. J Dairy Sci 2001; 84(5): 1140-8.

30. Turkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine milk. Zoonoses Public Health 2010; 57(3): 197-203.

31. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Moller N, Olsson-Liljequist B, et al. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother 2003; 52(2): 204-7.

32. Shariati L, Validi M, Tabatabaiefar MA, Karimi A, Nafisi MR. Comparison of real-time PCR with disk diffusion, agar screen and E-test methods for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Curr Microbiol 2010; 61(6): 520-4.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 07.05.2014
Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014
Accepted: 08.08.2014

Investigation of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of Methicillin-Resistant Strains (MRSA) in Staphylococcus Aureus Isolates Associated with Bovine Mastitis

Sayed Asghar Havaei PhD[1], Bahram Nasr Esfahani PhD[1], Nafisehsadat Hoseini MSc[2], Behnaz Assadbeigi[3]

Original Article

Abstract

Background: Staphylococcus aureus is one of the main causative agents in bovine mastitis. Resistance of some Staphylococcus aureus strains to antibiotics, particularly methicillin, can complicate the treatment of its infections. Moreover, the transmission of resistant strains into human is also important. Thus, the aim of this study was to investigate the prevalence of mastitis caused by Staphylococcus aureus in Isfahan dairy herds, Iran, and to determine the antimicrobial susceptibility pattern of the isolates.

Methods: A total of 450 milk samples were collected. After inoculation and applying the relevant tests, antibiotic resistance was determined via disk diffusion method in isolates. D-test method was performed for the detection of inducible clindamycin resistance (ICR). Then, methicillin-resistant strains (MRSA) were detected using oxacillin agar screening and cefoxitin disc diffusion methods.

Findings: Fifty-four Staphylococcus aureus were isolated. All isolates were sensitive to ciprofloxacin and gentamicin. Furthermore, 31, 25, 8, 7 and 2 isolates were resistant to erythromycin, clindamycin, tetracycline, oxacillin and cotrimoxazole, respectively. D-test was negative for all isolates. Nine methicillin-resistant strains were identified using oxacillin agar screening and ten methicillin-resistant strains were detected using cefoxitin disc diffusion methods.

Conclusion: Since it is expected that the prevalence of Staphylococcus aureus, especially antibiotic resistant strains in herds, be too negligible, even the low incidence reported in this study can lead to many problems. Therefore, applying an appropriate antimicrobial susceptibility test before the beginning of antibiotic therapy in bovine mastitis cases is of primary importance.

Keywords: Bovine mastitis, Staphylococcus aureus, Antibiotic resistance, Methicillin-resistant strains

Citation: Havaei SA, Nasr Esfahani B, Hoseini N, Assadbeigi B. **Investigation of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of Methicillin-Resistant Strains (MRSA) in Staphylococcus Aureus Isolates Associated with Bovine Mastitis** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): 1319-29

1- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Behnaz Assadbeigi, Email: beh69766@yahoo.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۲

بررسی جهش‌های ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمیک مغلوب استان هرمزگان با استفاده از روش‌های PCR-SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA

شهربانو پرچمی برجوئی[۱]، سمیه رئیسی[۲]، فاطمه رضائیان[۳]، فاطمه هیبتی[۳]، دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ناشنوایی شایع‌ترین اختلال حسی مادرزادی در جوامع امروزی می‌باشد. ناشنوایی ژنتیکی به دو حالت نشانگانی و غیر نشانگانی دیده می‌شود. ناشنوایی غیر نشانگانی با توارث مغلوب اتوزومی (ARNSHL یا Autosomal recessive non-syndromic hearing loss) شایع‌ترین شکل ناشنوایی است و تا کنون ۹۵ لوکوس برای آن نقشه‌یابی شده است که از این مناطق، ۴۱ ژن ناشنوایی شناسایی گردیده است. با وجود مطالعات زیاد، برای لوکوس DFNB۶۳ ژن LRTOMT (Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase) مطالعات اندکی انجام شده است. از این رو، بررسی جهش این لوکوس می‌تواند در شناخت بهتر ژن‌های مؤثر در ناشنوایی مؤثر باشد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۹۰ نمونه ناشنوایی استان هرمزگان مورد بررسی قرار گرفت. DNA نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم استخراج شد و سپس مرحله‌ی PCR (Polymerase chain reaction) انجام گرفت. بعد با استفاده از محصول PCR، مراحل SSCP (Single-strand conformation polymorphism) و HA (Heteroduplex analysis) صورت گرفت و نمونه‌هایی که دارای باندهای متفاوت بودند، به منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی‌یابی شدند.

یافته‌ها: ۸ نمونه در اگزون‌های مختلف (هر کدام در یک اگزون خاص) در بررسی باندهای SSCP دارای شیفت بودند که به منظور تعیین نوع تغییر نوکلئوتیدی توالی‌یابی شدند. در نتیجه‌ی توالی‌یابی، هیچ تغییر نوکلئوتیدی در هیچ کدام از اگزون‌های مورد بررسی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، بین جهش‌های ژن کد کننده‌ی LRTOMT و ناشنوایی غیر سندرومیک ارتباطی مشخص نشد. با توجه به این که زمان زیادی از کشف این ژن سپری نشده است، تحقیقات زیادی هم در رابطه با آن صورت نگرفته است. جهش‌های شناسایی شده در مطالعات انجام گرفته بر روی این ژن در سرتاسر جهان، تنها ۵ جهش می‌باشد که نقش کم‌رنگ آن را در ارتباط با ناشنوایی بیان می‌کند.

واژگان کلیدی: جهش، Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism، Polymerase chain reaction-heteroduplex، ژن Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase

ارجاع: پرچمی برجوئی شهربانو، رئیسی سمیه، رضائیان فاطمه، فاطمه هیبتی، هاشم‌زاده چالشتری مرتضی. **بررسی جهش‌های ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمیک مغلوب استان هرمزگان با استفاده از روش‌های PCR-SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ۱۳۳۷-۱۳۳۰

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری
Email: mchalesh@yahoo.com

مقدمه

ناشنوایی (HL یا Hearing Loss) شایع‌ترین اختلال حسی مادرزادی در جوامع امروزی می‌باشد (۴-۱). به نظر می‌رسد که این اختلال، بیش از تمام ناتوانی‌های دوران کودکی، مورد بحث و بررسی قرار گرفته باشد و این امر، شاید بدان سبب است که قدرت تکلم ارتباط نزدیکی با قدرت شنوایی دارد (۵). ناشنوایی غیر نشانگانی با توارث مغلوب اتوزومی (ARNSHL یا Autosomal recessive non-syndromic hearing loss) شایع‌ترین شکل ناشنوایی است و تا کنون ۹۵ لوکوس برای آن نقشه‌یابی شده است که از این مناطق، ۴۱ ژن ناشنوایی شناسایی گردیده است (۶، ۲). این ارقام برای حالت غالب اتوزومی ۵۴ لوکوس با ۲۷ ژن و برای وابسته به X، ۵ لوکوس و ۳ ژن، ۲ لوکوس Modifier، ۱ لوکوس Y-linked و ۱ لوکوس AUNA می‌باشند.

بر طبق مطالعات انجام گرفته، حدود ۵۰ درصد از ناشنوایی‌های غیر سندرومیک به واسطه‌ی جهش در ژن‌های GJB۲ (CX-۲۶) و GJB۶ (CX-۳۰) واقع در لوکوس DFNB۱ ایجاد می‌شوند (۷).

در ایران حدود ۱۸/۲۹-۱۶/۷ درصد موارد ARNSHL به وسیله‌ی ژن GJB۲ ایجاد می‌شود. بنابراین علل ژنتیکی حدود ۸۳ درصد از ARNSHL در کشورمان، به عوامل ژنتیکی دیگری وابسته است (۸). بنابراین، با توجه به طبیعت فوق‌العاده ناهمگن این بیماری و تنوع جمعیتی کشور، بررسی لوکوس‌های دیگر ناشنوایی برای قومیت‌ها و مناطق مختلف ایران بسیار ضروری می‌باشد (۱۰-۹).

طی تجزیه و تحلیل پیوستگی سراسری ژنومی بر روی ۳۷ شجره از خانواده‌های غیر خویشاوند از نقاط مختلف ایران، که توسط طباطبایی‌فر و همکاران صورت گرفته است، ضمن تأیید نتایج دیگر مطالعات انجام شده، یک دید کلی نسبت به فراوان‌ترین لوکوس‌های دخیل در بیماران ARNSHL ایرانی ارایه گردیده است که می‌تواند برای پژوهش و بالین مفید باشد. اولویت‌های ارایه شده توسط این مطالعه به ترتیب (از راست به چپ) DFNB۱، DFNB۴، DFNB۲، DFNB۲۱، DFNB۷/۱۱ و DFNB۶۳ می‌باشند (۸).

با توجه به لوکوس‌های پیش‌گفته، تا کنون در زمینه‌ی لوکوس DFNB۶۳ ژن LRTOMT (Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase) مطالعه‌ای صورت نگرفته است و نظر به پیشنهاد پژوهشگران مطالعه‌ی پیش‌گفته مبنی بر بررسی بیشتر این لوکوس در مطالعات بعدی بر روی بیماران ARNSHL، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی جهش‌های ژن LRTOMT انجام گرفت. البته لازم به ذکر است به دلیل این که حدود نیمی از ناشنوایی‌های غیر سندرومیک در ارتباط با جهش‌های ژن‌های GJB۲ و GJB۶ می‌باشند، در این پژوهش، حضور جهش در جایگاه ژنی DFNB۶۳ با استفاده از نمونه‌های ناشنوایی استان هرمزگان که برای جهش‌های CX-۲۶ و CX-۳۰ منفی بوده‌اند، بررسی شد (۹).

LRTOMT دارای ۱۰ اگزون و ۲ نوع قالب خواندن متناوب است و بنابراین دو پروتئین متفاوت LRTOMT۱ و LRTOMT۲ را کد می‌نماید که می‌توان این دو نوع را با روش لکه‌گذاری برای پروتئین شناسایی کرد. این دو نوع پروتئین در کدون‌های شروع ترجمه با هم تفاوت دارند.

اگزون‌های ۵، ۷ و ۸ چارچوب خواندن دوگانه دارند (۱۲). در مطالعه‌ی انجام گرفته بر مبنای بررسی جهش‌های این ژن، اگزون‌های ۸ و ۳ دارای بیشترین تغییر نوکلئوتیدی مرتبط با ناشنوایی بوده‌اند (۱۱). بنابراین این نقاط به عنوان نقاط داغ جهش در ارتباط با ناشنوایی مورد توجه هستند. هدف این بررسی، بر پایه‌ی شناسایی جهش در اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ در ژن LRTOMT بود.

روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۹۰ نمونه‌ی مبتلا به بیماری ناشنوایی از استان هرمزگان مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد استفاده از نظر جهش در ژن کانکسین ۲۶ مورد بررسی قرار گرفته و منفی بوده‌اند (۸). در انتخاب افراد ناشنوا، دقت شد که ناشنوایی آن‌ها ژنتیکی و دارای الگوی وراثتی غیر سندرمی آتوزومال مغلوب باشد. این مهم با بررسی اطلاعات موجود در پرسش‌نامه‌های تکمیل شده و شجره‌نامه‌ی به دست آمده از خانواده‌های ناشنوای مناسب، انجام شد. میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۱۳/۵ سال بود و ۴۳/۵ درصد آنان مذکر و ۵۶/۵ درصد مؤنث بودند.

از هر فرد به میزان ۵ ml خون وریدی دریافت و داخل لوله‌ی آزمایش حاوی ۱۲ µl EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۵ M ریخته شد. نمونه‌های خون تا زمان شروع استخراج در دمای ۲۰- °C نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از پروتکل استاندارد فنل- کلروفرم استخراج گردید (۱۳، ۷). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر Unico ۲۱۰۰ USA) مورد بررسی قرار گرفت. در اجرای مراحل PCR (Polymerase chain reaction)، اولین مرحله طراحی پرایمر با کیفیت و دقت مطلوب با استفاده از نرم‌افزارهای موجود است. در مطالعه‌ی حاضر، پرایمرهای مورد استفاده بر اساس توالی مربوط به ژن LRTOMT از پایگاه اطلاعاتی UCSC برای اگزون‌های ۱، ۲، ۳، ۵ و ۸ ژن کد کننده‌ی LRTOM با استفاده از نرم‌افزار Primer۳ Online طراحی شدند (جدول ۱).

در مطالعه‌ی حاضر، برای تکثیر نواحی مورد نظر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (PC۸۱۸ Japan، Astec) در حجم ۲۵ µl انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ µl بافر (۱۰ X) PCR، ۱/۵ µl از $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۰/۵ µl از مخلوط DNTP (Deoxyribonucleotide) (۱۰ mM)، ۰/۲ µl از هر کدام از پرایمرها (۵۰ PM)، ۱۰۰ ng از DNA ژنومی (۱/۵ µl) و در نهایت ۰/۵ U از آنزیم Taq پلیمراز (۵ U/µl) تهیه گردید (تمامی مواد مصرف شده از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند).

تکثیر توالی DNA اگزون‌های ژن مورد مطالعه با استفاده از شرایط دمایی پایه: ۱ سیکل ۹۵ °C و ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل ۹۵ °C و ۴۵ ثانیه، ۵۸ °C و ۵۰ ثانیه، ۷۲ °C و ۵۰ ثانیه و در نهایت، ۷۲ °C و ۵ دقیقه برای یک سیکل به منظور تکثیر نهایی مورد استفاده قرار گرفت. البته سیکل‌ها برای هر کدام از اگزون‌های مورد مطالعه با توجه به شرایط دمایی، نوع پرایمر و موارد دیگر تنظیم گردید.

به منظور مشاهده‌ی کیفیت و کمیت توالی‌های تکثیر یافته، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت (شرکت Merck آلمان). پس از الکتروفورز،

بـه منظـور مشـاهده‌ی بانـدهای DNA حاصـل، از روش رنـگ‌آمیـزی نیتـرات نقـره اسـتفاده شـد (۶). سـپس واکنش‌هـای PCR-HA (PCR-heteroduplex analysis) و PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) با استفاده از محصول PCR بـر اسـاس روش Nataraj و همکـاران صـورت گرفـت (۱۰-۹). نمونه‌هـای دارای بانـد متفـاوت بـر روی ژل الکتروفـورز SSCP و هترودوپلکس بـرای تأییـد نهـایی تعیـین تـوالی گردید. واکـنش تعیـین تـوالی بـا اسـتفاده از سیسـتم ABI (Capillary System) ۳۷۳۰ XL انجام شد (شکل ۱).

یافته‌ها

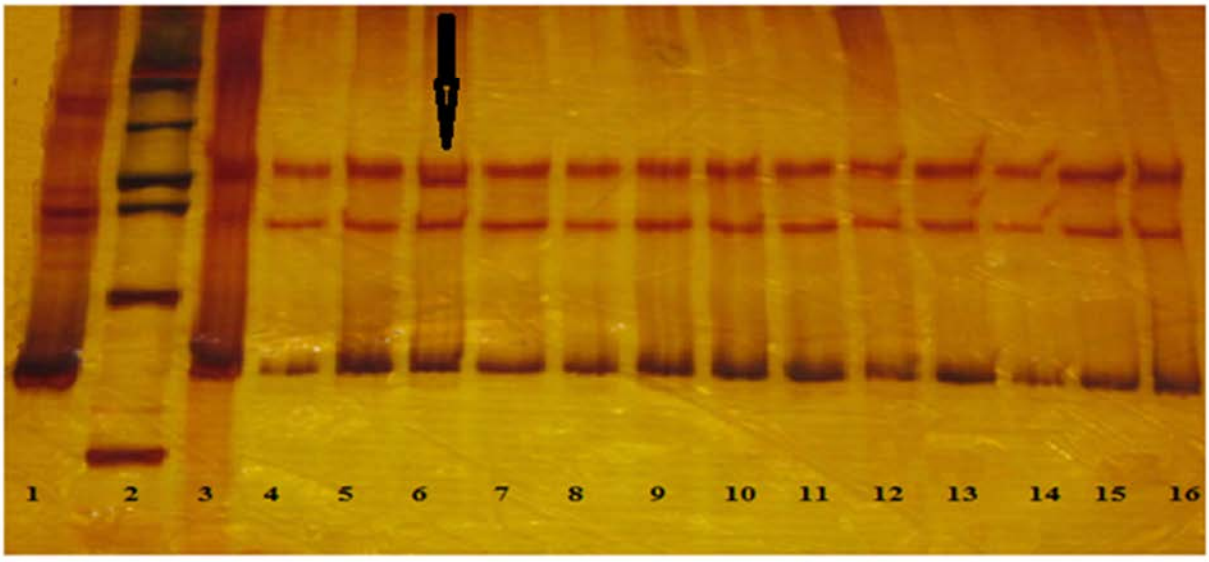
محصولات PCR تکثیر شده در مرحله‌ی قبـل، بـرای واکنش‌های SSCP و هترودوپلکس مورد استفاده قرار گرفتند. این روش برای غربالگری تغییرات موجود در توالی استفاده شد. این روش به صـورت همزمـان بـا روش هترودوپلکس به کـار رفـت. نتـایج ژل‌گـذاری هـیچ گونـه تفـاوت بانـدی را در نمونـه هـای مـورد مطالعه‌ی اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ روی ژل نشان نداد. لازم به ذکر است که در اگـزون ۳ ایـن ژن (تغییـر در بانـدهای SSCP)، نمونـه‌ی مشـکوک (تغییـر در ۵ نمونـه) مشـاهده گردیـد. پـس از تعیـین تـوالی ایـن نمونـه‌هـا تغییـر در آن‌هـا تأییـد نشـد. بـر اسـاس بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، در هیچ یـک از اگزون‌های مورد مطالعـه‌ی ژن LRTOMT، جهـش و یا تغییری مشاهده نشد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR (Polymerase chain reaction)

توالی پرایمر(۳→ ۵)	نوع پرایمر	اندازه‌ی قطعه (bp)	نام اگزون
GAAAGCAGTTGCCATGGAGT	F	۱۹۶	E۱
GTGGGGGAAATCTCAGATCC	R		
GAAAGCAGTTGACATGGAGT	FM*		
GCAAGGATGCAAGGAAGAGT	F	۲۴۸	E۳a
GCTCCTGTACCGAAGTGTTC	R		
GCTCCTGTACCGAAGGGTTC	RM*		
GCACCTTTGAATGATGGCCT	F	۲۵۹	E۳b
ACTCTCCCCTACCCTCCAAA	R		
GCACCTTTGAATGATTGCCT	FM*		
AGTATGGCTGTGGAGGGTTG	F	۲۷۰	E۵a
TTCCTCCATGGGGTTCCCAT	R		
TTCCTCCATGGGGTTACCAT	RM*		
GTGAATAAGCTGGCTGTCCT	F	۲۷۷	E۵b
CAAGGAATGGAGGGACTTGA	R		
GTGAATAAGCTGGCGGTCCT	FM*		
AGGATAATAATTGCTACTGGCAAAA	F	۲۶۴	E۸a
GTGAGCACGTAGCTGAAG	R		
GTGAGCACGTAGCGGAAG	RM*		
GGCACTACTTCCGATTGCTG	F	۲۶۲	E۸b
ATCCCAAATATTCCTTCACTGTCTT	R		
GGCACTACTTCCGATGGCTG	FM*		

F: پرایمر فوروارد؛ R: پرایمر ریورس؛ *FM و *RM: پرایمرهای موتانت (فوروارد یا ریورس)

a و b: به دلیل این که محصول PCR (Polymerase chain reaction) مربوط به اگزون ۳، ۵ و ۸ بزرگ می‌باشد و حداکثر بازدهی در روش PCR-SSCP داشتن محصولاتی با اندازه‌ی ۳۰۰-۱۵۰ جفت باز می‌باشد؛ از این رو برای این اگزون‌ها، دو جفت پرایمر طراحی شد (دو آمپلیکون) که در جدول با علامت‌های a و b مشخص شده‌اند.



شکل ۱. تشکیل باند مربوط به تفکیک DNA حاصل از PCR (Polymerase chain reaction) بر روی ژل SSCP-HA (single strand conformation polymorphism- heteroduplex) (اگزون ۳)

۱: نمونه‌ی شاهد مثبت که دارای نوکلئوتید تغییر یافته می‌باشد، ۲: DNA نشانگر bp ۱۰۰، ۶: نمونه‌ی دارای باند متغیر، سایر باندها: نمونه‌های افراد ناشنوا می‌باشند که تغییر الگوی باندی در آن‌ها دیده نمی‌شود.

بحث

بر اساس نتایج مشاهده شده در این مطالعه، جهش‌های احتمالی اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ ژن LRTOMT در ایجاد ناشنوایی در ناشنوایان غیر سندرومی تک‌گیر استان هرمزگان که مورد بررسی قرار گرفتند، تأثیر چندانی ندارند. Ahmed و همکاران طی مطالعه‌ای در اعضای تحت تأثیر واقع شده‌ی ۴ خانواده‌ی غیر مرتبط مبتلا به ناشنوایی مغلوب اتوزومی DFNB۶۳ چهار جهش هموزیگوت مختلف در اگزون‌های ۳ و ۸ را در ژن LRTOMT (۶۱۲۴۱۴.۰۰۰۴-۶۱۲۴۱۴.۰۰۰۱) شناسایی کردند. منشأ این خانواده‌ها ترکیه، تونس و پاکستان بود. در ادامه ایشان پیشنهاد بررسی این دو اگزون و ناحیه‌ی UTR ۳' در جمعیت‌های دیگر را عنوان کرده بودند. با توجه به عقیده‌ی Ahmed و همکاران، ناحیه‌ی UTR ۳' با در نظر گرفتن نوع قالب خوانده شدن برای چارچوب LRTOMT۱ و پروتئین(های) بیان شده، می‌توانست حایز اهمیت باشد (۱۱).

DU و همکاران ژن LRTOMT را در ۱۹۲ فرزند ناشنوای ارثی غیر مرتبط ایرانی آنالیز کردند و هموزیگوسیتی را برای یک جهش بی‌معنی در اگزون شماره‌ی ۳ در یک خانواده (۶۱۲۴۱۴.۰۰۰۵) و یک جهش هموزیگوت از نوع دگرمعنی (Missense) در اگزون شماره‌ی ۲ در خانواده‌ی دیگر، شناسایی کردند. البته دو تغییر هتروزیگوت در این ژن نیز توسط ایشان در این مطالعه گزارش شد (۱۲).

با توجه به مطالعات پیش‌گفته، میزان جهش‌های یافت شده در کشورهای مختلف بسیار پایین است و به صورت کلی حدود صفر است. نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از این است که میزان جهش در اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ بیماران غیر سندرومی تک‌گیر مورد مطالعه در استان هرمزگان، صفر است. بنابراین

نتایج مطالعات قبلی و مطالعه‌ی حاضر شباهت بسیار بالایی دارند که تا حدود زیادی نتایج حاصل از این مطالعه را تأیید می‌کنند (۱۲).

در نگاه کلی، اطلاعات محدودی در رابطه با نوع و فراوانی جهش‌های ژن کد کننده‌ی LRTOMT در جمعیت‌های مختلف وجود دارد. اما با در نظر گرفتن مطالعه‌ی Du و همکاران (۱۲) که تنها مطالعه‌ی کامل در مورد این ژن در جمعیت ایرانی قبل از این مطالعه بوده است، شاید بتوان این گونه نتیجه‌گیری کرد که در مورد این ژن، نرخ جهش در جمعیت ایرانی، در اگزون شماره‌ی ۲ هم‌سطح با دیگر اگزون‌های گزارش شده باشد.

با توجه به این که زمان زیادی از کشف ژن کد کننده‌ی LRTOMT سپری نشده است، تحقیقات زیادی هم در رابطه با آن صورت نگرفته است. با این وجود، مطالعاتی در نقاط مختلف جهان، بیانگر آن است که جهش‌های ژن LRTOMT نقش پررنگی در ایجاد ناشنوایی ندارند. جهش‌های شناسایی شده در سرتاسر جهان، تنها ۵ جهش می‌باشد که نقش کم‌رنگ آن را در ایجاد ناشنوایی بیان می‌کند.

نتیجه‌ی نهایی این که در این تحقیق، از تکنیک PCR-SSCP با احتمال خطای پایین، بهره گرفته شد و نتایج این روش با آزمایش‌های دیگری تأیید گردید. بنابراین با توجه به یافته‌های این مطالعه، احتمال می‌رود که این جهش‌ها نقش بارزی در ایجاد ناشنوایی در ناشنوایان غیر سندرومی تک‌گیر استان هرمزگان نداشته باشند. با این حال، مطالعات بیشتری لازم است تا اقوام و جمعیت‌های مختلف ایرانی از نظر میزان پراکندگی جهش‌های این ژن و ارتباط آن با ناشنوایی و حتی نوع ناشنوایی بررسی دقیق‌تری شوند تا اطلاعات مورد نیاز جهت پیشگیری و مدیریت اختلال شنوایی وابسته به این ژن تأمین گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با اقتباس از طرح تحقیقاتی با عنوان «بررسی جهش اگزون‌های ۱، ۳، ۵ و ۸ ژن LRTOMT (لوکوس DFNB۶۳) در بیماران ایرانی مبتلا به ناشنوایی ژنتیکی با استفاده از روش‌های PCR- SSCP، PCR-HA و توالی‌یابی DNA» با شماره‌ی ۵۷۷-۷۴-۰۷-۱۳۹۰ تدوین گردیده است.

References

1. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon ACJ, Faxon DP, Freed MD, et al. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing Committee to Revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease) developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. J Am Coll Cardiol 2006; 48(3): e1-148.
2. Hilgert N, Smith RJ, van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? Mutat Res 2009; 681(2-3): 189-96.
3. Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. Genet Med 2007; 9(7): 393-408.
4. Tucci M, Stucci S, Strippoli S, Silvestris F. Cytokine overproduction, T-cell activation, and defective T-regulatory functions promote nephritis in systemic lupus erythematosus. J Biomed Biotechnol 2010; 2010: 457146.
5. Sedighi Moghaddam B, Pazoki R. First internal evaluation of microbiology, parasitology and

immunology department in Semnan University of Medical Sciences. Koomesh 2002; 3(3): 137-44. [In Persian].
6. Rapley BI, Rowland RE, Page WH, Podd JV. Influence of extremely low frequency magnetic fields on chromosomes and the mitotic cycle in Vicia faba L., the broad bean. Bioelectromagnetics 1998; 19(3): 152-61.
7. Kenneson A, van Naarden BK, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. Genet Med 2002; 4(4): 258-74.
8. Tabatabaiefar M, Montazer Zohour M, Shariati L, Jabbari Chaleshtori, Ashrafi K, Gholami A, et al. Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes and the genetic linkage analysis of five common DFNB loci in the Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. J Sci IR Iran. 2010; 21(2): 105-12.
9. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE, Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. Electrophoresis 1999; 20(6): 1177-85.
10. Rossetti S, Tomei MC, Nielsen PH, Tandoi V. "Microthrix parvicella", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. FEMS Microbiol Rev 2005; 29(1): 49-64.
11. Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, Belyantseva IA, Mosrati MA, Collin RW, et al. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. Nat Genet 2008; 40(11): 1335-40.
12. Du X, Schwander M, Moresco EM, Viviani P, Haller C, Hildebrand MS, et al. A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(38): 14609-14.
13. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Res 1989; 17(20): 8390.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 09.05.2014
Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014
Accepted: 13.08.2014

Screening LRTOMT Gene (DFNB63 locus) in Patients with Recessive Nonsyndromic Hearing Loss in Hormozgan Province, Iran

Shahrbanoo Parchami-Barjui MSc[1], Somayeh Reiisi MSc[2], Fatemeh Rezaiean[3], Fatemeh Heybati[3], Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Congenital hearing loss is the most common sensory disorder is modern societies. Two modes of syndromic and nonsyndromic genetic hearing loss can be seen. Autosomal recessive non-syndromic inheritance hearing loss (ARNSHL) is the most common form of inheritance hearing loss. So, far mapping it, 95 loci of the 41 regions of deafness genes have been identified. Despite numerous studies in this field, for DFNB63 (Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase or LRTOMT gene), few studies have been conducted. Thus, the locus mutations can help us to better understand the genes involved in hearing loss.

Methods: 90 cases of hearing loss in Hormozgan province, Iran, were studied. DNA extracted via phenol-chloroform method. Polymerase chian reaction (PCR) was performed. Then, the product was used to perform polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and polymerase chain reaction-heteroduplex analysis (PCR-HA) methods. Samples with different bands were sequenced to determine the nucleotide changes.

Findings: In different exons, 8 samples (each in a specific exon) were sequenced to determine the type of changes that shift single-strand conformation polymorphism bands. No change was found in nucleotide sequencing of exons in any of the groups.

Conclusion: The results showed no relationship between non-syndromic deafness and LRTOMT gene mutations. As this gene is discovered in recent years, there are few studies on it. So far, only 5 mutation of this gene have been identified in the world that can determine pale relationship of the gene and hearing loss.

Keywords: Mutation, PCR-HA, PCR-SSCP, Leucine rich transmembrane and O-methyltransferase (LRTOMT) gene

Citation: Parchami-Barjui S, Reiisi S, Rezaiean F, Heybati F, Hashemzadeh-Chaleshtori M. **Screening LRTOMT Gene (DFNB63 locus) in Patients with Recessive Nonsyndromic Hearing Loss in Hormozgan Province, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): 1330-7

1- Department of Biotechnology, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2- PhD Student, Department of Genetics, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
3- MSc Student, Department of Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
4- Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
Corresponding Author: Morteza Hashemzadeh Chaleshtori PhD, Email: mchalesh@yahoo.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۳

اثرات عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رشد رده‌های سلول‌های سرطانی HT-۲۹ و CT-۲۶

سهیلا خضرایی مرادیان[۱]، دکتر علیرضا عندلیب[۲]، دکتر مزدک گنجعلی خانی حاکمی[۳]، زهره سفری[۴]، احد زارع[۵]، دکتر غلامعلی کاردر[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان‌های دستگاه گوارش به خصوص روده‌ی بزرگ یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جوامع غربی است. به دلیل تغییر الگوی تغذیه‌ای در جوامع در حال توسعه نیز، این گونه سرطان‌ها در حال افزایش است. امروزه استفاده از طب گیاهی و مکمل، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. شیرین بیان یک گیاه باستانی در طب گیاهی است که بسیاری از خواص درمانی مانند اثر ضد سرطان و ضد التهابی، برای آن ذکر شده است. در این مطالعه، اثر عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رده‌ی سلولی سرطان روده‌ی بزرگ انسانی (HT-۲۹) و سرطان روده‌ی بزرگ موشی (CT-۲۶) در مقایسه با سلول‌های طبیعی (HEK۲۹۳) بررسی شده است.

روش‌ها: ابتدا عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان پس از آسیاب کردن ریشه‌ی خشک آن در بافر فسفات سالین (PBS) در دمای اتاق تهیه شد. پس از دیالیز در همین بافر، غلظت پروتئینی آن به روش برادفورد تعیین گردید. رده‌های سلولی HT-۲۹، CT-۲۶ و HEK-۲۹۳ در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ C^o، توسط غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی شیرین بیان تیمار شدند. سمیت سلولی غلظت‌های مختلف شیرین بیان با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی شد. در ادامه، بررسی وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با استفاده از سیستم فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: غلظت‌هایی تا ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پروتئینی، برای تکثیر سلول‌های طبیعی سمی نیستند. در حالی که توان زیستی (Viability) رده‌های سلولی CT-۲۶، HT-۲۹ و HEK-۲۹۳ به ترتیب تا ۲۹/۳، ۴۲/۵ و ۷۰/۰ درصد به روش MTT اندازه‌گیری شدند. به علاوه، روش سنجش آپوپتوز با فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های CT-۲۶، HT-۲۹ و HEK-۲۹۳ که با غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره‌ی پروتئینی تیمار شده بودند، به ترتیب به میزان ۸/۰۰ ± ۴۷/۷۲ (P = ۰/۰۲۶)، ۸/۲۱ ± ۳۴/۹۳ (P = ۰/۰۵۶) و ۶/۵۰ ± ۱۷/۵۰ (P = ۰/۰۷۰) روی سلول‌های سرطانی اثرات مهار کنندگی رشد داشتند و همچنین موجب برانگیختن آپوپتوز در آن‌ها شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان به عنوان یک داروی مکمل برای مهار رشد سلول‌های سرطانی روده بزرگ مناسب باشد ضمن این که برای تأیید آن، مطالعه‌ی رده‌های سلولی بیشتر مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: شیرین بیان، آپوپتوز، سرطان روده‌ی بزرگ

ارجاع: خضرایی مرادیان سهیلا، عندلیب علیرضا، گنجعلی خانی حاکمی مزدک، سفری زهره، زارع احد، کاردر غلامعلی. **اثرات عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان بر رشد رده‌های سلول‌های سرطانی HT-۲۹ و CT-۲۶.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ۱۳۴۶-۱۳۳۸

۱- کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان و مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶- استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر غلامعلی کاردر
Email: gakardar@tums.ac.ir

مقدمه

بعد از بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان را می‌توان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در جهان به شمار آورد. سرطان‌های دستگاه گوارش به خصوص روده‌ی بزرگ یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جوامع غربی است و به دلیل تغییر الگوی تغذیه‌ای در جوامع در حال توسعه نیز، این گونه سرطان‌ها در حال افزایش است؛ به طوری که سومین سرطان شایع در مردان و زنان می باشد (۱). روش های مختلفی برای درمان سرطان روده‌ی بزرگ مانند جراحی، شیمی درمانی و ایمونوتراپی معرفی شده‌اند، اما هیچ کدام توفیق قابل توجهی در این امر نداشته‌اند و بیشتر این روش‌ها تنها در به تأخیر انداختن رشد آن مؤثر بودند (۲).

در سال‌های اخیر، به دلیل عوارض جانبی نامطلوب ترکیبات سنتتیک دارویی به خصوص در داروهای شیمی درمانی، تمایل به سمت مصرف گیاهان دارویی بیشتر شده است (۳). شیرین بیان با نام علمی Glycyrrhiza glabra از خانواده‌ی Papilionaceae گیاه بومی منطقه‌ی مدیترانه است و در اکثر نقاط کشور به خصوص در فارس و لرستان می‌روید. فرآورده‌های دارویی به دست آمده از شیرین بیان از ریشه‌ها و ساقه‌های زیرزمینی گیاه فراهم می‌آیند. این گیاه اثرات گسترده‌ی فارماکولوژیکی دارد که از آن جمله می‌توان به اثرات ضد التهاب، ضد سرطان، خواب‌آور، ضد سرفه، محافظ کبد، درمان زخم، ضد سم، ضد آلرژی، درمان کننده‌ی هپاتیت ویروسی و تنظیم کننده‌ی فعالیت سیستم ایمنی اشاره کرد (۱۱-۴).

بخش عمده‌ای از فعالیت‌های اشاره شده از عصاره ی گیاه شیرین بیان را به آگلیکون ساپونی بتا گلسیرینیک اسید نسبت می‌دهند که ساختمان شبه استروئیدی دارد و مشتق سنتتیک آن در درمان زخم معده و دوازدهه مطرح است (۶). عصاره ی این گیاه حاوی ترکیب گلیسیریزین یا اسید گلیسریزیک و نمک‌های پتاسیم و کلسیم است. اسید گلیسریزیک و گلیسیریزین برای درمان زخم های گوارشی مفید است و مقدار آن با توجه به شرایط محیطی و گونه‌ی گیاه ۲۰-۵ درصد می‌باشد. ریشه‌های این گیاه حاوی کومارین، فلاون، روغن‌های فرار و استرول گیاهی نیز هست. همچنین ریشه‌ی شیرین بیان، دارای گلوکز، ساکاروز، آسپارژین، رزین و کمی اسانس می‌باشد (۱۲).

بررسی‌ها نشان داده است ترکیبات غیر پروتئینی موجود در ریشه‌ی گیاه شیرین بیان مانند ترکیبات اتانولی، فنلی، فلاونوئیدی و پلی ساکاریدی، موجب آپوپتوز سلولی می‌شوند و در نتیجه می‌توانند از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند. همچنین مطالعات بسیاری بر اثر انتخابی این ترکیبات بر روی سلول‌های سرطانی از طریق برانگیختن آپوپتوز انجام شده است (۱۶-۱۳).

آپوپتوز یک مرگ طبیعی در شرایط فیزیکی و توسعه‌ی ارگانیسم‌های سلولی است و موجب تغییراتی در مورفولوژی سلول‌ها مانند متورم شدن غشای سلول‌ها، متراکم شدن کروماتین، فعالیت کاسپازها و قطعه قطعه شدن DNA می‌شود (۱۷).

با توجه به این که هنوز مطالعه‌ای در مورد اثر ترکیبات پروتئینی این گیاه بر روی سلول‌های سرطانی صورت نگرفته بود، در این مطالعه اثر عصاره‌ی پروتئینی گیاه شیرین بیان بر روی مهار رشد رده‌های سلولی سرطان روده‌ی بزرگ (HT-۲۹ و CT-۲۶) بررسی شد.

روش‌ها

۱- نحوه‌ی عصاره‌گیری

ریشه ی خشک شیرین بیان توسط آسیاب به صورت پودر درآمد. ۱۵ g شیرین بیان با ۵۰ ml محلول فسفات سالین (PBS) (۰/۲ M، pH: ۷/۴) مخلوط گردید. پس از ۴۸ ساعت، توسط سانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی در بافر PBS یک شب دیالیز (کیسه ی دیالیز با منافذ ۱۴ KDa، Sigma) شد و به این ترتیب، مواد زاید و ناخواسته‌ای از جمله مواد سلولزی و پوسته‌های سلولی و مواد غیر پروتئینی از عصاره حذف گردید و محلولی قهوه‌ای رنگ حاصل شد. این محلول برای استفاده‌های بعدی در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد. غلظت پروتئین‌های محلول به روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

۲- الکتروفورز عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان

به کمک الکتروفورز به روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) باندهای مختلف پروتئینی شیرین بیان به دست آمد. به این ترتیب که پس از آماده‌سازی ژل، ۳۰ µl از عصاره‌ی PBS شیرین بیان با ۵۰ µl بافر نمونه، مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای حدود ۱۰۰ °C جوشانده شد. سپس نمونه‌ها و نشانگر پروتئینی درون چاهک‌های ژل منتقل شدند. ولتاژ در ساعت اول انجام آزمون، ۶۰ V و پس از نفوذ نمونه به درون ژل پایین (ژل ۷/۵ درصد)، ولتاژ تا ۱۷۰ V افزایش یافت. زمان انجام آزمون حدود ۴ ساعت بود. سپس ژل با استفاده از رنگ کوماسی بلو R-۳۵۰ رنگ‌آمیزی شد. برای رنگ‌بری و از بین بردن رنگ‌های اضافی، از رنگ‌بر حاوی آب، متانل و اسید استیک استفاده شد. میزان حرکت نسبی باندها (RM = Relative mobility) از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید و با استفاده از باندهای مربوط به نشانگر پروتئینی (PageRuler prestained protein ladder, Thermo scientific)، وزن مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز با قرار دادن حرکت نسبی در نمودار به دست آمد.

$$RM=\frac{\text{مسافت طی شده پروتئین از مبداء}}{\text{مسافت طی شده رنگ از مبداء}}$$

۳- کشت سلولی

رده‌ی سلولی آدنوکارسینومای روده‌ی بزرگ انسانی (HT-۲۹)، رده‌ی سرطانی روده‌ی بزرگ موشی (CT-۲۶) و سلول‌های HEK-۲۹۳ (به عنوان شاهد طبیعی) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS یا) در فلاسک کشت سلولی ۲۵ cm^2 (Nunc دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور ۳۷ °C و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند.

۴- بررسی تیمار و سمیت عصاره‌ی شیرین بیان با روش MTT assay

به منظور بررسی اثر عصاره ی پروتئینی شیرین بیان بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان نامحلول بنا شده است. جهت انجام آزمایش، سلول‌های HT-۲۹، CT-۲۶ و HEK-۲۹۳ در پلیت ۹۶ خانه ای و در هر خانه ۴×۱۰^3 سلول در حجم ۱۵۰ µl محیط DMEM کشت داده شدند. در سه چاهک به عنوان شاهد صفر فقط ۱۵۰ µl محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS افزوده شد.

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ^{o}C ۳۷، سلول ها با غلظت‌های µg/ml ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان تیمار شدند. از محلول MTT (۵ mg/ml)، µl ۲۰ در هر خانه ریخته شد. بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در دمای ^{o}C ۳۷، محلول رویی حذف و µl ۱۵۰ حلال MTT (ml ۱۵ ایزوپروپانول و µl ۲۰ HCl) اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، توسط دستگاه خوانش الایزا جذب نوری نمونه‌ها در nm ۵۹۰ اندازه‌گیری شد. همه‌ی آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام شد.

۵- بررسی وقوع آپوپتوز سلولی به وسیله‌ی فلوسایتومتری

در این آزمون از کیت (Roche, Germany) Annexin-V-FLUOS استفاده شد. به منظور بررسی آپوپتوز، سلول‌های HT-۲۹، CT-۲۶ و HEK-۲۹۳ در پلیت ۲۴ تایی کشت داده شدند. در هر خانه ۴×۱۰^{۴} سلول در ml ۱ محیط DMEM سرم‌دار کشت استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ^{o}C ۳۷، سلول‌ها با غلظت‌های µg/ml ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ عصاره‌ی شیرین بیان تیمار شدند و برای هر سلول، ۳ خانه به عنوان شاهد صفر در نظر گرفته شد که فاقد هر گونه عصاره و فقط حاوی محیط کشت و سلول مورد نظر بود. همه‌ی آزمون‌ها به صورت سه تایی انجام شد.

به منظور ارزیابی آپوپتوز، در ابتدا توسط سر سمپلر استریل، محتویات چاهک‌های پلیت کشت سلولی مورد نظر برداشته شد و در لوله‌های اپندرف استریل با حجم cc ۱/۵ تخلیه گردید. سپس µl ۵۰ تریپسین به چاهک‌ها اضافه گردید و بعد از گذشت چند دقیقه، محیط کشت جمع شده از هر چاهک دوباره به آن برگردانده شد تا تریپسین خنثی گردد. سلول‌ها به وسیله‌ی سمپلر از هر خانه جمع شدند و به منظور شستشوی سلول‌های موجود، لوله‌های اپندرف به مدت ۵ دقیقه و با دور g ۲۲۰۰ سانتریفوژ گردید.

سپس مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب سلولی باقی مانده، PBS سرد اضافه شد و پس از پیپتاژ به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۲۰۰ سانتریفوژ گردید. در لوله‌ای جداگانه، µl ۱۵ انکسین V + µl ۲۰ PI + ml ۱ Incubation buffer با یکدیگر مخلوط شدند. پس از حذف مایع رویی، به رسوب سلولی µl ۱۰۰ از محلول آماده شده، اضافه گردید. پس از پیپتاژ کافی، نمونه‌ها در لوله‌های مخصوص دستگاه فلوسایتومتری تخلیه شدند و توسط دستگاه فلوسایتومتری آنالیز گردیدند. همچنین یک لوله، برای شاهد مثبت در نظر گرفته شد که باید بیشترین مقدار آپوپتوز را نشان می داد. به این صورت که بعد از جمع‌آوری سلول‌ها و شستشو با PBS، µl ۵۰۰ فرمالدئید ۳ درصد به آن اضافه گردید و در دمای ^{o}C ۴ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و پس از آن تمامی مراحل پیش گفته برای رنگ‌آمیزی آن تکرار شد.

یک لوله نیز برای شاهد منفی به کار گرفته شد که در آن، تنها سلول‌های شستشو شده با PBS بدون هیچ رنگ‌آمیزی وجود داشت که مقدار اتوفلورسانس دستگاه را نشان می‌داد.

با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) و با کمک مشاور آمار، اطلاعات مربوط به توان سلولی و آپوپتوز رده‌های سلولی مختلف مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

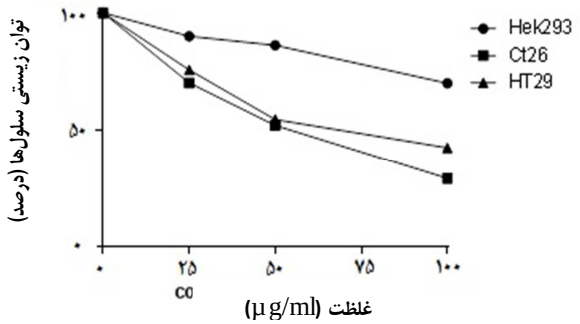
نتایج آزمایش MTT

بررسی میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان، رشد سلول‌های HT-۲۹ و CT-۲۶ را به صورت وابسته به دوز کاهش می دهند. در تفسیر نتایج این آزمایش، میزان جذب نوری (OD یا Optical density) نمونه‌های مربوط به دوز صفر (سلول های تیمار نشده که به عنوان شاهد منفی استفاده شدند)، به عنوان توان زیستی (Viability) ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و با مقایسه‌ی OD سایر دوزهای مورد استفاده‌ی عصاره با دوز صفر عصاره، اختلاف بین اثر دوزهای مختلف عصاره محاسبه گردید.

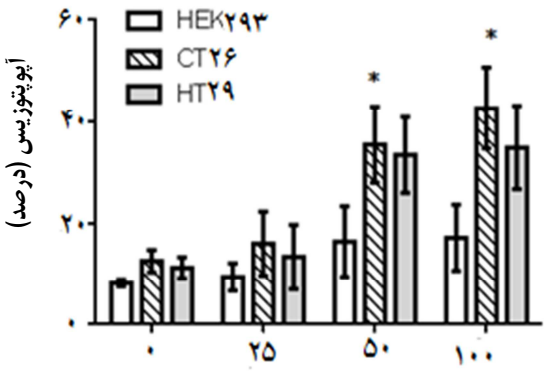
نتایج مقایسه ی دوزهای مختلف عصاره بر روی رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه، وابسته به دوز بودن این تیمار سلولی را نشان داد و با افزایش دوز تیماری عصاره، توان زیستی سلول‌ها کاهش نشان داد. با توجه به شکل ۱، غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره، اثر کمی بر سلول‌های طبیعی دارد. در حالی که در سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، باعث کاهش قابل توجه رشد شده است.

بررسی نتایج آپوپتوز به روش فلوسایتومتری

نتایج مقایسه‌ی دوزهای مختلف عصاره بر روی رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه، وابسته به دوز بودن این تیمار سلولی را نشان داد و با افزایش دوز عصاره، افزایش یافت. به عنوان شاهد صفر، از سلول‌های همان رده‌ی سلولی که با عصاره تیمار نشده بودند، استفاده شد. همانطور که در شکل ۲ آمده است، دوز ۲۵ µg/ml عصاره، تأثیر چندانی بر روی سلول‌ها ندارد. در حالی که دوز ۵۰ µg/ml عصاره، به طور معنی داری موجب القای آپوپتوز، در سلول‌های CT-۲۶ شد ($P < ۰/۰۵۰$). غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره، بیشترین اثر مهاری را داشت که در مقایسه با گروه شاهد، اثر مهاری آن معنی دار بود (شکل ۲) ($P = ۰/۰۲۶$: CT-۲۶، $P = ۰/۰۵۶$: HT-۲۹).



شکل ۱. نمودار مقایسه‌ی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان بر رده‌های سلولی سرطانی (HT-۲۹ و CT-۲۶) و رده‌ی سلولی طبیعی (HEK-۲۹۳) به روش MTT



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان بر مهار رشد سلول‌های CT-۲۶، HT-۲۹ و HEK-۲۹۳ در مقایسه با شاهد صفر به روش فلوسایتومتری. نمودارهای ستون نشان دهنده‌ی میانگین ± انحراف معیار است.

*** $P < ۰/۰۵۰$ معنی‌دار بود.**

میزان آپوپتوز هر کدام از رده‌های سلولی در جدول ۱ درج شده است.

بحث

اثرات گیاهان مختلف بر روی سرطان بررسی شده است، به عنوان مثال در مطالعه‌ای نشان داده شد که عصاره‌ی سیر خام، منجر به بیان ژن کاسپاز ۳ و در نتیجه موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی روده‌ی بزرگ در رده‌ی سلولی COLO-۲۰۵ شد (۱۸). در مطالعه‌ی دیگری عصاره‌ی برگ زیتون با توقف چرخه‌ی سلولی در مرحله ی G_0/G_1 موجب مهار سرطان سینه در رده‌ی سلولی MCF-۷ گردیده است (۱۹).

بررسی ها نشان داده است که ترکیبات غیر پروتئینی موجود در ریشه ی گیاه شیرین بیان مانند ترکیبات اتانولی، فنلی، فلاونوئیدی و پلی‌ساکاریدی، موجب آپوپتوز سلولی می شوند. در نتیجه، می‌توانند از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کنند (۱۶-۱۳). اثرات عصاره ی اتانولی ریشه‌ی گیاه شیرین بیان بر روی آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطان پستان بررسی و مشاهده شده است که این عصاره موجب برانگیختن آپوپتوز در این سلول‌ها گردیده است (۱۴).

مطالعات دیگری نیز بر روی اثرات ضد سرطانی ترکیبات پلی‌ساکاریدی موجود در این گیاه صورت گرفته است (۱۰). بررسی اثرات عصاره‌ی اتانولی ریشه‌ی گیاه شیرین بیان بر روی تکثیر سلولی و آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطان پستان MCF-۷ نشان داده است که این عصاره موجب جلوگیری از رشد این سلول‌ها در مرحله‌ی G_1 و برانگیختن آپوپتوز در این سلول‌ها گردیده است (۱۰).

گزارش ها نشان داده است که فلاونوئید موجود در شیرین بیان، اثر ضد کارسینوژنیک دارد. این مولکول باعث آپوپتوز در سلول‌های هپاتوما و ملانوما شده است (۲۱-۲۰). همچنین عصاره ی متانولی این گیاه موجب جلوگیری از رشد سلول‌های لوسمی مونوبلاستی و برانگیختن آپوپتوز در این سلول‌ها گردیده است. در شیرین بیان، ترکیب ۴, ۲, ۴ تری هیدروکسی کالکون (ایزولیکو رتیجنین) با اثر حفاظتی در دوزهای مختلف موجب کاهش توان زیستی و افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطان پروستات در موش و انسان شده است. فلاونوئیدها و ترکیبات پلی‌فنلی موجود در این گیاه، جزء عوامل شیمی درمانی هستند که به نظر می‌رسد چرخه‌ی رشد سلول‌های توموری را در چند هدف مورد تهاجم قرار می‌دهند (۱۵).

جدول ۱. میانگین آپوپتوز رده‌های سلولی مورد مطالعه بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان

رده‌ی سلولی	۰ µg/ml	۲۵ µg/ml	۵۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml
HEK-۲۹۳	۸/۲۰ ± ۰/۷۰	۹/۳۷ ± ۲/۷۹	۱۶/۳۶ ± ۸/۰۰	۱۷/۱۵ ± ۶/۵۰
مقدار P		P = ۰/۴۰۲	P = ۰/۴۳۹	P = ۰/۰۷۰
CT-۲۶	۱۲/۵۰ ± ۲/۲۳	۱۵/۹۷ ± ۶/۳۰	۳۵/۵۲ ± ۷/۵۰	۴۷/۷۲ ± ۸/۰۰
مقدار P		P = ۰/۶۲۳	P = ۰/۰۴۸	P = ۰/۰۲۶
HT-۲۹	۱۱/۲۰ ± ۲/۰۸	۱۳/۳۶ ± ۶/۳۰	۳۳/۴۷ ± ۷/۵۰	۳۴/۹۳ ± ۸/۲۱
مقدار P		P = ۰/۶۱۱	P = ۰/۰۶۱	P = ۰/۰۵۶

میانگین ± انحراف معیار و مقدار P مقایسه‌ی هر یک از شرایط نسبت به شاهد صفر است.

در مطالعه‌ی Jung و همکاران (۱۵) و نیز Tomoda و همکاران (۲۲) فراکشن‌های به دست آمده از پلی‌ساکاریدهای ریشه‌ی شیرین بیان باعث فعال شدن ماکروفاژها شده است و همچنین اثر تنظیمی این مولکول بر روی عامل رونویسی هسته‌ای (AP-۱) بررسی گردیده است که این پروتئین موجب مهار پروموتور القایی تومور و در نتیجه باعث مهار دگرگونی (Transformation) سلولی می‌شود (۲۳). همچنین اثر یک پلی‌فنل جدید موجود در ریشه‌ی شیرین بیان بر روی آپوپتوز و جلوگیری از رشد سلول در مرحله‌ی G_2/M و فسفوریلاسیون bcl۲ سلول‌های توموری بررسی گردیده است (۱۳).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که عصاره‌ی پروتئینی شیرین بیان در غلظت‌های مورد استفاده موجب مهار رشد سلول‌های هر دو رده‌ی سرطانی می شود؛ در حالی که تأثیر اندکی بر روی سلول‌های طبیعی داشت. مقایسه‌ی رده‌ی سلول‌های HT-۲۹ و CT-۲۶ با یکدیگر نشان داد که سلول‌های CT-۲۶ به دوز ۱۰۰ µg عصاره حساس‌ترند و مقاومت کمتری نشان می‌دهند. احتمال می‌رود این نتیجه به دلیل اختلاف اثر عصاره، بر روی رده‌ی سلولی انسانی و موشی است و به نظر می‌رسد که بر رده‌ی موشی، اثر قوی‌تری دارد. از این رو با مطالعه‌ی حیوانی این عصاره‌ها، در صورت اثربخشی در مدل موشی، شاید بتوان به اثربخشی در انسان هم امیدوار بود. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که عصاره‌ی پروتئینی ریشه‌ی شیرین بیان به عنوان یک داروی مکمل برای مهار رشد سلول‌های سرطانی روده‌ی بزرگ مناسب باشد. ضمن این که برای تأیید این مطالعه، رده‌های سلولی بیشتری مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از تمام کسانی که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند. تمامی هزینه‌های انجام این پژوهش درقالب یک طرح پژوهشی مصوب، توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان پرداخت شده است.

References

1. Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 2009; 22(4): 191-7.
2. Khan R, Khan AQ, Lateef A, Rehman MU, Tahir M, Ali F, et al. Glycyrrhizic Acid Suppresses the Development of Precancerous Lesions via Regulating the Hyperproliferation, Inflammation, Angiogenesis and Apoptosis in the Colon of Wistar Rats. PLoS ONE 2013; 8(2): e56020.
3. Tai CJ, Wang WC, Wang CK, Wu CH, Yang MD, Chang YJ, et al. Fermented Wheat Germ Extract Induced Cell Death and Enhanced Cytotoxicity of Cisplatin and 5-Fluorouracil on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 121725.
4. Turpie AG, Thomson TJ. Carbenoxolone sodium in the treatment of gastric ulcer with special reference to side-effects. Gut 1965; 6(6): 591-4.
5. Wang GS, Han ZW. The protective action of glycyrrhiza flavonoids against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. Yao Xue Xue Bao 1993; 28(8): 572-6.
6. Kroes BH, Beukelman CJ, van den Berg AJ, Wolbink GJ, van DH, Labadie RP. Inhibition of human complement by beta-glycyrrhetinic acid. Immunology 1997; 90(1): 115-20.
7. Moon A, Kim SH. Effect of Glycyrrhiza glabra roots and glycyrrhizin on the glucuronidation in rats. Planta Med 1997; 63(2): 115-9.
8. Pompei R, Flore O, Marccialis MA, Pani A, Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. Nature

1979; 281(5733): 689-90.
9. Pompei R, Paghi L, Ingianni A, Uccheddu P. Glycyrrhizic acid inhibits influenza virus growth in embryonated eggs. Microbiologica 1983; 6(3): 247-50.
10. Shimizu N, Tomoda M, Takada K, Gonda R. The core structure and immunological activities of glycyrrhizan UA, the main polysaccharide from the root of Glycyrrhiza uralensis. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1992; 40(8): 2125-8.
11. Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. Life Sci 2002; 71(12): 1449-63.
12. Mir Heidar H. Herbal sciences. Tehran, Iran: Nashr Farhang Publication; 1994. [In Persian].
13. Rafi MM, Vastano BC, Zhu N, Ho CT, Ghai G, Rosen RT, et al. Novel polyphenol molecule isolated from licorice root (Glycrrhiza glabra) induces apoptosis, G2/M cell cycle arrest, and Bcl-2 phosphorylation in tumor cell lines. J Agric Food Chem 2002; 50(4): 677-84.
14. Jo EH, Kim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, et al. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (Glycyrrhiza uralensis) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. Cancer Lett 2005; 230(2): 239-47.
15. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. J Nutr Biochem 2006; 17(10): 689-96.
16. Wang ZY, Nixon DW. Licorice and cancer. Nutr Cancer 2001; 39(1): 1-11.
17. Kim A, Yim NH, Yeul Ma J. Samsoeum, a traditional herbal medicine, elicits apoptotic and autophagic cell death by inhibiting Akt/mTOR and activating the JNK pathway in cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 2013; 13: 233.
18. Su CC, Chen GW, Tan TW, Lin JG, Chung JG. Crude extract of garlic induced caspase-3 gene expression leading to apoptosis in human colon cancer cells. In Vivo 2006; 20(1): 85-90.
19. Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. Food Chem Toxicol 2011; 49(1): 179-84.
20. Rossi T, Benassi L, Magnoni C, Ruberto AI, Coppi A, Baggio G. Effects of glycyrrhizin on UVB-irradiated melanoma cells. In Vivo 2005; 19(1): 319-22.
21. Hsu YL, Kuo PL, Lin LT, Lin CC. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells. Planta Med 2005; 71(2): 130-4.
22. Tomoda M, Shimizu N, Kanari M, Gonda R, Arai S, Okuda Y. Characterization of two polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the root of Glycyrrhiza uralensis. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1990; 38(6): 1667-71.
23. Hsiang CY, Lai IL, Chao DC, Ho TY. Differential regulation of activator protein 1 activity by glycyrrhizin. Life Sci 2002; 70(14): 1643-56.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 17.05.2014
Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014
Accepted: 25.08.2014

The Effect of Protein Extract of Licorice Root in Proliferation of HT-29 and CT26 Cancer Cell Lines

Soheila Khazraei-Moradian MSc[1], Alireza Andalib PhD[2], Mazdak Ganjalikhani-Hakemi PhD[3], Zohreh Safari[4], Ahad Zare[5], Gholam Ali Kardar PhD[6]

Original Article

Abstract

Background: Gastrointestinal cancers, especially colon cancer, are of the most common causes of death in western countries. Already, herbal and complementary medicine has been considered as a supplement treatment. The licorice is an ancient plant in herbal medicine that has many health benefits such as anti-cancer and anti-inflammatory effects. So, the present study was designed to assess the effect of protein extract of licorice root on human colon cancer cell line (HT-29), murine colon cancer (CT26) and normal cells (HEK293) for considering the cell growth inhibition potential after treatment with the extracts.

Methods: Protein extracts of licorice root powder was prepared after grinding in phosphate buffered saline (PBS) at room temperature. After the dialysis in buffer, the protein concentration was determined via Bradford method. The HT-29, CT-26 and HEK-293 cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. After 24 hour of incubation at 37°C, the cells were treated with the concentrations of 25, 50 and 100 µg/ml of licorice extract. Cytotoxicity was evaluated via MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. In addition, the inductions of apoptosis (Annecin-V-Fluos staining method) in the treated cells were evaluated using flow cytometric analysis.

Findings: Up to 100 µg/ml of the protein extract had not toxin effect on normal cell proliferation (HEK293). However, the viability of CT26, HT29 and HEK293 was reduced by 29.3%, 42.5% and 70%, respectively. Moreover, the treated CT26, HT29 and HEK293 cells showed the apoptosis percentages of 47.72 ± 8.00 (P = 0.026), 34.93 ± 8.21 (P = 0.056) and 17.5 ± 6.5 (P = 0.07), respectively, in comparison with not-treated cells.

Conclusion: It appears that protein extract of licorice root could inhibit the colon cancer cell line proliferation and can be used as an adjuvant treatment.

Keywords: Licorice, Apoptosis, Colon cancer

Citation: Khazraei-Moradian S, Andalib A, Ganjalikhani-Hakemi M, Safari Z, Zare A, Kardar GhA. **The Effect of Protein Extract of Licorice Root in proliferation of HT-29 and CT26 Cancer Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): 1338-46

1- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan AND Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan
3- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan
4- Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- PhD student, Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- Assistant Professor, Immunology Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Gholam-Ali Kardar PhD, Email: gakardar@tums.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۲

بررسی منابع مختلف آب شهر اصفهان از نظر آلودگی به هلیکوباکترپیلوری با استفاده از روش مولکولی Fluorescent nested polymerase chain reaction

دکتر فرح تاج نواب اکبر[۱]، دکتر رسول صالحی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هلیکوباکترپیلوری یکی از عوامل عفونت در دستگاه گوارش است که انتشار جهانی دارد. عقیده بر این است که عفونت از دوران کودکی کسب می‌شود. راه انتقال باکتری به درستی روشن نشده است و یکی از راه‌هایی که برای آن فرض می‌شود، انتقال از طریق آب است. هدف از این مطالعه، بررسی وجود هلیکوباکترپیلوری در منابع آب شهر اصفهان از جمله آب شهری، آب چاه‌های اطراف اصفهان وآب زاینده‌رود بود.

روش‌ها: در این مطالعه در مجموع ۱۰۰ l آب از منابع پیش‌گفته جمع‌آوری و جهت شناسایی باکتری با روش Fluorescent nested PCR (Fluorescent nested polymerase chain reaction) و با استفاده از سه پرایمر برای ژن‌های UerC، ۱۶srRNA و Adhesion-۱ مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: با بررسی آب‌های مورد مطالعه، آب زاینده‌رود آلوده به این باکتری شناخته شد. در مورد نمونه‌های آب چاه‌ها، منطقه‌ی شمالی ۳ نمونه، منطقه‌ی غربی دو نمونه، منطقه‌ی شرقی صفر و منطقه‌ی جنوبی ۳ نمونه آلودگی به هلیکوباکترپیلوری را نشان دادند. در خصوص آب شرب شهری، فقط دو نمونه از شرق اصفهان آلودگی به هلیکوباکترپیلوری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با استفاده از پرایمر ژن۱۶srRNA، UreC و روش Fluorescent nested PCR و فلوروکروم CY۵ تعداد بسیارکمی باکتری مورد شناسایی قرار گرفتند.

واژگان کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، ۱۶srRNA، Fluorescent nested polymerase chain reaction ، UreC، Adhesion-۱، آب

ارجاع: نواب اکبر فرح تاج، صالحی رسول. **بررسی منابع مختلف آب شهر اصفهان از نظر آلودگی به هلیکوباکترپیلوری با استفاده از روش مولکولی Fluorescent nested PCR.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ۱۳۵۳-۱۳۴۷

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری عامل التهاب دستگاه گوارش و زخم دوازدهه می‌باشد و وجود آن در مخاط معده با بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان دستگاه گوارش، لنفوما (MALT, Mucosa associated tissue) و بیماری عروق کرونر مرتبط می‌باشد (۱).

هلیکوباکترپیلوری از طرف سازمان بهداشت جهانی (WHO یا World Health Organization) به عنوان کارسینوژن درجه‌ی یک قلمداد شده است. شناسایی منابع و راه انتقال عفونت هلیکوباکترپیلوری به منظور پیشگیری حایز اهمیت است (۲).

راه انتقال میکروارگانیسم مشخص نمی‌باشد، اما

۱- استادیار، گروه باکتری و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رسول صالحی
Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

یکی از راه‌های انتقال از شخص به شخص و از طریق مدفوعی- دهانی و دهانی- دهانی می‌باشد (۳). گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی نیمی از جمعیت جهان به این باکتری در دست می‌باشد (۴). عفونت به طور معمول از دوران کودکی کسب می‌شود (۵).

سویه‌هایی از هلیکوباکترپیلوری در معده و یا روده‌ی کوچک جانوران دیگر از جمله پریمات‌ها، سگ‌ها، گربه‌ها، جوندگان و پرندگان مانند نمونه‌های کلینیکی انسان یافت شده است (۶). بنا بر بعضی گزارش‌ها، ممکن است آب به عنوان عاملی در انتقال این باکتری نقش داشته باشد (۷). در یک مطالعه در کشور پرو، منابع آب شهری به عنوان عامل احتمالی در افزایش خطر عفونت به هلیکوباکترپیلوری فرض شده است (۸).

آلودگی منابع آب به هلیکوباکترپیلوری ازکشورهای پرو، سوئد، مکزیک، ژاپن و آمریکا گزارش شده است (۱۱-۱۰، ۹، ۷، ۲). هلیکوباکترپیلوری درآب به فرم کوکوئید تغییر شکل می‌دهد که قابل کشت نیست، اما زنده می‌ماند. از این رو بررسی وجود DNA هلیکوباکترپیلوری در آب، با انواع روش‌های PCR (Polymerase chain reaction) امکان پذیر می‌باشد (۲).

در این تحقیق، با توجه به احتمال وجود تعداد بسیار کم باکتری در آب که جداسازی آن با روش‌هایی مانند کشت مشکل می‌باشد، از روشی استفاده شد که از حساسیت کافی برخوردار باشد و امکان شناسایی باکتری را میسر سازد. بنابراین از روش Fluorescent nested PCR و سه پرایمر Adhesion-۱، ۱۶srRNA و UreC جهت شناسایی باکتری در آب‌های منطقه‌ی اصفهان (لوله‌کشی، چاه‌های اطراف و رودخانه‌ی زاینده‌رود) استفاده شد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع توصیفی به روش نمونه‌گیری آسان بود و مقدار هر نمونه‌ی آب ۳۳ l بود. آب از رودخانه‌ی زاینده‌رود به طور تصادفی از مناطق مختلف برداشت شد.آب چاه‌ها و نیز آب لوله‌کشی شهر از مناطق شمال، جنوب، غرب و شرق برداشت شد. آب‌های تغییر رنگ داده از مطالعه حذف شدند. احتمال جداسازی هلیکوباکترپیلوری از نمونه‌های آب P = ۰/۴۰۰ و با دقت d = ۰/۱۰۰ بود (۱۰).

بر اساس فرمول محاسبه‌ی حجم نمونه ($n = z^2.p\ (1-p)/d^2$ و z_α = ۱/۹۶) حجم کل نمونه‌ها ۱۰۰ l محاسبه گردید و با توجه به این که سه نوع نمونه‌ی آب بایستی در این مطالعه بررسی می‌شد، از هر یک از منابع، ۳۳ l آب جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری هر دو هفته ۸ l از مناطق پیش‌گفته انجام شد. نمونه‌ها در بهار ۱۳۹۲ طی ۲ ماه با وقفه‌ی زمانی ۲ هفته بین نمونه‌گیری‌ها جمع‌آوری شدند. با برداشت هر یک از ۸ l آب طی چهار مرحله از هر یک از منابع، عملیات فیلتر کردن و استخراج DNA بر روی آن‌ها انجام پذیرفت. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شدند تا ناخالصی‌های مشهود آن حذف گردد. سپس نمونه‌های آب فیلتر شده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۵ µ عبور داده شد تا باکتری‌های موجود در آب بر روی فیلتر باقی بماند. سپس فیلتر به آرامی با ۱ ml بافر فسفا ت شستشو داده شد و پس از انتقال محتویات به یک اپندرف ۱/۵ ml به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.

سوپرناتانت به دست آمده تخلیه و به تـه نشسـت موجود در تیـوپ µl ۱۰۰ بـافر فسـفات اضـافه و بـه خـوبی ورتکـس گردیـد. سـپس از کیـت QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen ,Germany) و طبق دستورالعمل آن استخراج DNA انجام پـذیرفت. جهت بررسی این که حداقل توان پروتکل PCR برای تشخیص ژنوم باکتری در نمونـه‌ی موردآزمـایش چـه میزان است، رقت سریالی از DNA بـاکتری برابـر بـا ۱۰۰۰-۱۰نسخه معادل ژنـوم بـاکتری تهیـه گردیـد و پـس از انجـام فلورسـنت PCR مـورد ارزیـابی قـرار گرفت. پروتکل طراحی شده قادر بود کمتـرین میـزان هلیکوباکترپیلوری را به سهولت تشخیص دهد.

پـس از اسـتخراج DNA، بـا اسـتفاده از روش Fluorescent nested PCR و سـه جفـت پرایمـر ۱-Adhesion، UreC و ۱۶srRNA نمونـه‌هـا مـورد ارزیابی قرار گرفتند.

از پرایمر ۱۶srRNA برای بررسـی مناسـب بـودن DNA اسـتخراج شـده بـرای واکـنش PCR اسـتفاده گردید. از این طریق، تمامی نمونه‌های استخراج شـده به لحـاظ قابلیـت تکثیـر بـا PCR غربـالگری شـدند. تشـخیص هلیکوبـاکترپیلوری بـا اسـتفاده از پرایمـر UreC انجام پذیرفت (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱. مقادیر مواد مصرفی استفاده شده بر حسب µl در PCRهای انجام شده

پرایمر	DNA	H_2O	پرایمرها (µl)	پلیمراز Taq	$MgCl_2$	dNTP	بافر X ۱۰	کل
srRNA۱۶	۵	۱۴/۰۰	F = ۱ R = ۱	۰/۲۵	۰/۷۵	۰/۵	۲/۵	۲۵
Helicobacter pylori (PCR دور اول)	۵	۱۰/۸۵	F = ۱/۵ R = ۱/۵	۰/۴۰	۰/۷۵	۰/۵	۵/۰	۲۵
Helicobacter pylori (PCR دور دوم)	۳ از دور اول	۱۴/۶۰	F = ۱/۵ R= ۱/۵	۰/۴۰	۱/۵۰	۰/۵	۲/۵	۲۵

PCR: Polymerase chain reaction; dNTP: Deoxynucleotide

جدول ۲. توالی پرایمرهای به کار رفته و برنامه‌های PCR (Polymerase chain reaction)

پرایمر	توالی	شرایط انجام PCR
srRNA۱۶	۳´ CCTACGGGAGGCAGCAGTAG ۵´ ۳´CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA-۵´	مرحله‌ی ۱: ^oC ۹۴، ۵ دقیقه (۱ سیکل) مرحله‌ی ۲: ^oC ۹۴، ۳۰ ثانیه- ^oC ۶۰، ۳۰ ثانیه- ^oC ۷۲، ۳۰ ثانیه (۳۵ سیکل) مرحله‌ی ۳: ^oC ۷۲، ۱ دقیقه (۱ سیکل)
Helicobacter pylori (Nested PCR)	دور اول: UreC-F ۳´ AAGCCTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-۵´ ۳´ AAGCCTACTTTCTAACACTAACGC-۵´UreC-R دور دوم: UreC-F ۳´ CTTTCTTCTCAAGCAATTGTC-۵´ UreC-R ۳´ CAAGCCATCGCCGGTTTTAGC -۵´	دور اول: C^o ۹۴، ۵ دقیقه (۱ سیکل)- C^o ۹۴، ۴۵ ثانیه- C^o ۵۶، ۴۵ ثانیه- C^o ۷۲، ۴۵ ثانیه (۱۵ سیکل)- ^oC ۷۲، ۵ دقیقه (۱ سیکل) دور دوم: C^o ۹۴، ۵ دقیقه (۱ سیکل)- C^o ۹۴، ۳۰ ثانیه- C^o ۶۴، ۳۰ ثانیه- C^o ۷۲، ۳۰ ثانیه (۴۵ سیکل)- C^o ۷۲، ۵ دقیقه (۱ سیکل)

برای بالا بردن کیفیت واکنش PCR از آنزیم AmpliTaq Gold استفاده گردید. با پرایمرهای مربوط به ژن Adhesion-۱ نتایج مطلوبی به دست نیامد و از این رو، از پرایمرهای ژن UreC برای تشخیص ژنوم هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌ها استفاده شد. پرایمر فوروارد با فلوروکروم Cy۵ نشاندار گردید تا محصول PCR فلورسنت گردد و بتوان با دستگاه DNA Sequencer که از حساسیت بالایی برخوردار است، استفاده شود. نرم‌افزار مربوط که از طرف کارخانه‌ی سازنده‌ی دستگاه DNA Sequencer روی دستگاه نصب گردیده بود، کار آنالیز محصولات PCR را انجام داد. برای تمامی واکنش‌های PCR شاهدهای مثبت و منفی مناسب لحاظ گردید.

پس از انجام واکنش PCR مقدار ۳ µl از محصول PCR با ۳ µl از Loading dye مخصوص دستگاه Sequencer ALF-Express DNA مخلوط شد و بر روی دستگاه بارگذاری گردید. پس از ران شدن نمونه‌ها، به مدت ۸ ساعت آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار دستگاه انجام پذیرفت و نمونه‌ها از نظر مثبت یا منفی بودن طبقه‌بندی گردیدند.

یافته‌ها

DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای ۱۶srRNA چک شدند تا وجود باکتری درآن‌ها و مناسب بودن DNA استخراج شده برای استفاده در واکنش PCR تأیید گردد. کلیه‌ی نمونه‌ها با استفاده از پرایمر ۱۶srRNA به خوبی تکثیر شدند. تهیه‌ی رقت‌های سریالی برای ارزیابی کارایی پروتکل طراحی شده جهت تشخیص ژنوم هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌ها، نشان داد که کمترین رقت که نشان دهنده‌ی ۱۰ کپی از ژنوم هلیکوباکترپیلوری بود، قابل تشخیص می‌باشد.

از نظر وجود ژنوم هلیکوباکترپیلوری، نمونه‌های آب زاینده‌رود در همه‌ی موارد مثبت بودند. در مورد نمونه‌های آب چاه نتایج به ترتیب به دست آمد:

منطقه‌ی شمالی ۳ نمونه، منطقه‌ی غربی ۲ نمونه و منطقه‌ی جنوبی ۳ نمونه آلودگی به هلیکوباکترپیلوری را نشان دادند و هیچ نمونه‌ای از آب‌های منطقه‌ی شرقی آلوده نبودند. در خصوص آب شرب شهری، فقط از نمونه‌های شرق اصفهان ۲ نمونه آلودگی داشتند، اما برای بقیه‌ی نمونه‌ها آلودگی با هلیکوباکترپیلوری دیده نشد

بحث

راه انتقال هلیکوباکترپیلوری به درستی روشن نیست (۳). در دو دهه‌ی گذشته، مقالاتی انتشار یافته‌اند مبنی بر این که ممکن است هلیکوباکترپیلوری از طریق آب منتقل شود (۱۱-۷). هلیکوباکترپیلوری درآب به شکل کوکوئید تغییر شکل می‌یابد که توانایی زنده ماندن را دارد، اما قابل کشت نیست و فقط با روش‌های مولکولی قابل شناسایی می‌باشد (۲).

نتایج مثبت بررسی با روش‌ای مولکولی از کشورهای آمریکا، انگلستان، سوئد، پرو، برزیل، اسپانیا و پاکستان گزارش شده است (۱۶-۱۰، ۸-۷).

هدف از تحقیق حاضر، جداسازی هلیکوباکترپیلوری از آب‌های شهر اصفهان (زاینده‌رود، چاه و شرب) با استفاده از پرایمرهای Adhesion-۱، UreC و ۱۶srRNA و روش حساس Fluorescent nested PCR بود. این روش قادر به شناسایی تعداد بسیار کم باکتری در نمونه می‌باشد (۱۴).

DNA استخراج شده دراین تحقیق بااستفاده از پرایمرهای ۱۶srRNA چک شدند تا وجود باکتری در آن‌ها و مناسب بودن DNA استخراج شده در واکنش PCR تأیید گردد. با استفاده از پرایمر ۱۶srRNA کلیه نمونه‌ها به خوبی تکثیر شدند. Horiuch و همکاران از ژاپن گزارشی از بررسی آب‌های چاه با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA و فلورسانس CY۳ با نتایج مثبت از ۵۰ نمونه ارایه کردند که مشابه تحقیق حاضر است (۲).

همچنین Mazari-Hiriat و همکاران با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA و روش Nested PCR در پنج سیستم آبی مکزیکوسیتی بر روی ۱۳۹ نمونه تحقیقی انجام دادند که ۵۸ مورد از آن‌ها را مثبت گزارش کردند که با تحقیق حاضر مشابه می‌باشد (۷).

Adnan و همکاران نیز با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA موفق به جداسازی هلیکوباکترپیلوری از آب شدند که مشابهت تحقیق حاضر است (۱۷).

در این تحقیق از پرایمر ژن UreC که ژن اصلی در هلیکوباکترپیلوری است، استفاده شد (۱۸) که با نشان‌دار کردن پرایمر فوروارد با فلوروکروم CY۵، باعث فلورسنت شدن محصول PCR گردید. با اتخاذ این استراتژی، جداسازی باکتری انجام شد که با سایر تحقیقات انجام شده مطابقت دارد. بهرامی و همکاران با استفاده از ژن UreC و روش PCR نتایج مثبتی از آب‌های شرب، یونیت دندانپزشکی و آب‌سردکن‌های شهراصفهان ارایه نمودند (۱۹)؛ اما Ander و همکاران با استفاده از ژن UreC و hepA و روش Real time PCR موفق به جداسازی باکتری نشدند که در استفاده از ژن UreC با تحقیق ما مشابه اما در عدم تشخیص باکتری در نمونه‌های مورد آزمایش، با پژوهش حاضر مغایر است (۲۰).

در تحقیق حاضر، هیچ یک از نمونه‌ها با پرایمر ژن Adhesion نتیجه‌ی مثبتی نداشت که با تحقیق Horiuch و همکاران (۲) و نیز Rasheed و همکاران (۱۱) مطابقت دارد. تأثیر ترکیباتی مانند کلرین بر روی باکتری به درستی روشن نیست. در پژوهش‌های Gia و همکاران (۲۱) و نیز Sulami و همکاران (۲۲) نشان داده شده است که هلیکوباکترپیلوری، میزان ۰/۵ mg/l کلرین را می‌تواند تحمل کند. این احتمال وجود دارد که در تحقیق حاضر، وجود تعداد نمونه‌های مثبت بیشتر مربوط به آب‌های چاه و زاینده‌رود، به همین علت بوده است. این امر، نیاز به بررسی بیشتری دارد. با توجه به سایر تحقیقات و مقایسه‌ی آن‌ها با تحقیق حاضر، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA و UreC و روش Fluorescent nested PCR و فلوروکروم CY۵، تعداد بسیار کم باکتری شناسایی شدند.

همچنین بر اساس نتایج این مطالعه مشخص می‌شود که علاوه بر آب چاه‌ها که آلوده به هلیکوباکترپیلوری است و در صورت شرب می‌تواند موجب انتقال عفونت گردد، آب شرب شهری از منطقه‌ی شرق اصفهان نیز آلوده است. این مسأله می‌تواند به دلیل وجود آلودگی از سر منشأ تصفیه‌خانه باشد و یا در خطوط انتقال آب و شبکه‌ی توزیع در اثر شکستگی‌ها و نشت آب و ارتباط یافتن با محیط خارج ایجاد شده باشد. همچنین ممکن است باکتری‌های ایجادکننده‌ی بیوفیلم به جدار داخلی لوله‌های آب چسبیده و بیوفیلم ایجاد کنند که چنین محلی موضعی مناسب برای تجمع و تکثیر باکتری‌ها است. این احتمال نیز

وجـــود داردکـــه هلیکوبـــاکترپیلوری از چنـــین بیوفیلم‌هایی برای محافظت و تکثیـر اسـتفاده کنـد و منابع آب را پس از ورود بـه شـبکه‌ی توزیـع آلـوده نماید (۲۲).

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشـکی اصفهان به دلیل حمایت مالی از این پژوهش تقـدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, et al. Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. Br Heart J 1994; 71(5): 437-9.
2. Horiuchi T, Ohkusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y. Helicobacter pylori DNA in drinking water in Japan. Microbiol Immunol 2001; 45(7): 515-9.
3. Parsonnet J, Shmuely H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of Helicobacter pylori from healthy infected adults. JAMA 1999; 282(23): 2240-5.
4. Vyse AJ, Gay NJ, Hesketh LM, Andrews NJ, Marshall B, Thomas HI, et al. The burden of Helicobacter pylori infection in England and Wales. Epidemiol Infect 2002; 128(3): 411-7.
5. Brown LM. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev 2000; 22(2): 283-97.
6. Fox JG. The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. Gut 2002; 50(2): 273-83.
7. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Calva JJ. Helicobacter pylori in water systems for human use in Mexico City. Water Sci Technol 2001; 43(12): 93-8.
8. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet 1991; 337(8756): 1503-6.
9. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. Gastroenterology 1996; 110(4): 1031-5.
10. Hegarty JP, Dowd MT, Baker KH. Occurrence of Helicobacter pylori in surface water in the United States. J Appl Microbiol 1999; 87(5): 697-701.
11. Hulten K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L. Presence of Helicobacter species DNA in Swedish water. J Appl Microbiol 1998; 85(2): 282-6.
12. Baker KH, Hegarty JP. Presence of Helicobacter pylori in drinking water is associated with clinical infection. Scand J Infect Dis 2001; 33(10): 744-6.
13. Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of Helicobacter pylori in water and stool specimens. J Clin Microbiol 1995; 33(8): 2162-5.
14. Findlay I, Matthews PL, Mulcahy BK, Mitchelson K. Using MF-PCR to diagnose multiple defects from single cells: implications for PGD. Mol Cell Endocrinol 2001; 183(Suppl 1): S5-12.
15. Cellini L, Del VA, Di CM, Di CE, Favaro M, Donelli G. Detection of free and plankton-associated Helicobacter pylori in seawater. J Appl Microbiol 2004; 97(2): 285-92.
16. Fujimura S, Kato S, Kawamura T. Helicobacter pylori in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. Lett Appl Microbiol 2004; 38(6): 517-21.
17. Khan A, Farooqui A, Kazmi SU. Presence of Helicobacter pylori in drinking water of Karachi, Pakistan. J Infect Dev Ctries 2012; 6(3): 251-5.
18. Al-Sulami AA, Al-Taee AM, Juma'a MG. Isolation and identification of Helicobacter pylori from drinking water in Basra governorate, Iraq. East Mediterr Health J 2010; 16(9): 920-5.
19. Bahrami AR, Rahimi E, Ghasemian SH. Detection of Helicobacter pylori in city water, dental units' water, and bottled mineral water in Isfahan, Iran. ScientificWorldJournal 2013; 2013: 280510.
20. Janzon A, Sjoling A, Lothigius A, Ahmed D, Qadri F, Svennerholm AM. Failure to detect Helicobacter pylori DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive real-time PCR assays. Appl Environ Microbiol 2009; 75(10): 3039-44.
21. Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. Persistence of Helicobacter pylori in heterotrophic drinking-water biofilms. Appl Environ Microbiol 2008; 74(19): 5898-904.
22. Percival SL, Thomas JG. Transmission of Helicobacter pylori and the role of water and biofilms. J Water Health 2009; 7(3): 469-77.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 04.07.2014
Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014
Accepted: 13.09.2014

Evaluation of Various Water Resources in Isfahan, Iran, for the Presence of Helicobacter Pylori Using Fluorescent Nested Polymerase Chain Reaction

Farah Taj Navab-Akbar PhD[1], Rasoul Salehi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Helicobacter pylori infection is one of the most common infectious agents worldwide. However, origin and the mode of transmission of this bacterium have not been clearly explained. One of the most probable routs of Helicobacter pylori transmission is through water resources. The aim of this study was to evaluate the presence of Helicobacter pylori in tap waters, well waters and Zayandeh Rood River collected from various locations in Isfahan, Iran.

Methods: Totally, 100 liters of water were collected from Zayandeh Rood River, wells and drinking water pipeline network in the north, west, south and west locations of Isfahan city. Collected waters first subjected to filteration through 0.25 µm, then, filters were washed with phosphate buffered saline (PBS) and the washed out PBS used for DNA extraction. For DNA extraction, QiAamp DNA Mini Kit was used, fluorescent nested polymerase chain reaction was used for detection of Helicobacter pylori genome using UreC, 16srRNA and adhesion gene specific primers.

Findings: Our results showed Helicobacter pylori infection in Zayandeh Rood river, well waters and drinking water from eastern region of Isfahan.

Conclusion: Using primers srRNA16, UreC, fluorescent nested polymerase chain reaction method and fluorochromes 5CY, very little number of bacteria were identified.

Keywords: Helicbacter pylori, Fluroscent nested polymerase chain reaction, UreC, 16srRNA, Adhesion-1, Water

Citation: Navab-Akbar FT, Salehi R. **Evaluation of Various Water Resources in Isfahan, Iran, for the Presence of Helicobacter Pylori Using Fluorescent Nested Polymerase Chain Reaction.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): 1347-53

1- Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۷

اثر امواج الکترومغناطیسی پیوسته با فرکانس پایین بر غلظت متابولیت سروتونین تولید شده در هسته‌ی رافه‌ی مغز موش‌های صحرایی بالغ

دکتر داریوش شهبازی[۱]، لیلا شیری[۲]، دکتر حجت‌اله علایی[۳]، دکتر ناصر نقدی[۴]، دکتر سعید کرمانی[۵]، حسین افروزی[۶]، علی کیانی[۷]، مجتبی اکبری[۸]

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: طبق مطالعات متعدد، امواج الکترومغناطیس با فرکانس پایین (ELF یا Extremely low frequency)، بر بیولوژیک بدن تأثیرات گسترده‌ای دارد. این امواج به خاطر ماهیت الکتریکی سیستم عصبی و نوروترانسمیترها، بر این سیستم آثاری به جای می‌گذارد که در برخی موارد، درمانی و در برخی موارد، مخرب است. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر امواج الکترومغناطیس با فرکانس پایین (ELF)، با فرکانس ۱۰ Hz و شدت ۵۴۰-۷۲۰ µT، بر سطح متابولیت سروتونین (۵-HIAA یا 5-Hydroxyindoleacetic acid) در هسته‌ی رافه‌ی مغز موش‌های نر بالغ بود.

روش‌ها: با استفاده از یک کویل مغناطیسی، میدان ELF تولید شد. شدت این میدان در مرکز کویل ۶۹۰ µT بود. تعداد ۶ موش صحرایی، روزانه ۳ ساعت و به مدت ۱۵ روز متوالی تحت این امواج قرار گرفتند. پس از آن، از هر موش صحرایی به روش میکرودیالیز، ۶ نمونه‌ی ۴۰ µl از هسته‌ی رافه‌ی مغز جمع‌آوری شد. سپس این نمونه‌ها به وسیله‌ی دستگاه کروماتوگرافی با فشار بالا (HPLC-ECD یا High pressure liquid chromatography- electro chemical detector)، سنجش و میزان متابولیت سروتونین آن به دست آمد و با گروه شاهد مقایسه گردید.

یافته‌ها: امواج ELF با مشخصات پیش‌گفته، به طور معنی‌داری متابولیت سروتونین در هسته‌ی رافه را نسبت به گروه شاهد کاهش داد ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: امواج ELF، در سیستم سروتونرژیک تأثیرگذار است و می‌توان در درمان برخی بیماری‌ها از آن استفاده کرد.

واژگان کلیدی: میدان الکترومغناطیس، ۵- هیدروکسی ایندول استیک اسید، میکرودیالیز، کروماتوگرافی با فشار بالا، هسته‌ی رافه

ارجاع: شهبازی داریوش، شیری لیلا، علایی حجت‌اله، نقدی ناصر، کرمانی سعید، افروزی حسین، کیانی علی، اکبری مجتبی. **اثر امواج الکترومغناطیسی پیوسته با فرکانس پایین بر غلظت متابولیت سروتونین تولید شده در هسته‌ی رافه‌ی مغز موش‌های صحرایی بالغ.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ۱۳۶۲-۱۳۵۴

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- استاد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استاد، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵- استادیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- دانشجوی دکتری، گروه شیمی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۷- دانشجوی دکتری، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۸- دانشجوی دکتری، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: لیلا شیری
Email: shiri33@gmail.com

مقدمه

میدان‌های الکترومغناطیسی که وابسته به محصولات، انتقالات و استفاده از الکتریسیته‌اند، در تمامی جوامع صنعتی یافت می‌شوند. با گسترش تکنولوژی‌های مدرن، توجه عمومی بیش از پیش به اثرات پرتوهای الکترومغناطیسی بر بیولوژی بدن، معطوف شده است (۱). این امواج گستره‌ی طیفی بسیار وسیعی دارند که بر اساس مقدار بسامدشان تقسیم‌بندی شده‌اند. برای مثال، فرکانس زیر ۳۰۰ Hz را فرکانس بسیار پایین (Extremely low frequency یا ELF) می‌نامند (۲). در فرکانس‌های پایین اجزای الکتریکی و مغناطیسی موج الکترومغناطیس، از هم جدا می‌شوند و هر کدام از این دو میدان به صورت مجزا عمل می‌کنند (۵-۳).

در رابطه با تأثیرات بیولوژیکی امواج ELF، مطالعات فراوانی تا کنون انجام شده است. برای مثال در حوزه‌ی In vitro، در رابطه با اثرات مثبت و منفی امواج ELF، تحقیقاتی صورت گرفته است (۹-۶، ۴). در حوزه‌ی In vivo نیز به تأثیرات امواج ELF، پرداخته شده است (۱۹-۱۰، ۴).

تعداد بسیار کمی از مطالعات، اثر امواج ELF بر رهایش میانجی‌های عصبی را مورد بررسی قرار داده‌اند (۲۰، ۴). برخی از مطالعات نیز به اثرات درمانی امواج ELF پرداخته‌اند (۲۹-۲۱). حتی این امواج در برخی تکنیک‌های کلینیکی نورولوژیکی و نوروفیزیولوژیکی، کاربرد داشته است (۳۰، ۴).

مغز بنا بر ماهیت خود فعالیت الکتریکی زیادی دارد (۴). پس یک تحریک مغناطیسی و یا الکتریکی، به راحتی بر مغز اثر می‌گذارد.

سروتونین به عنوان نوروترانسمیتر در هسته‌های رافه‌ی ساقه‌ی مغز یافت می‌شود. سروتونین پس از عمل در سیستم سروتونرژیک با آنزیمی به نام MAO (Monoamine oxidase)، به متابولیتش با نام ۵- هیدروکسی ایندول استیک اسید (HIAA-۵ یا 5-Hydroxyindoleacetic acid) تبدیل می‌شود (۳۱). خلق و خو، ادراک، پاداش، خشم، پرخاشگری، اشتها، حافظه، جنسیت، و توجه، از جمله فرایندهای نوروفیزیولوژیکی و رفتاری وابسته به سروتونین‌اند (۳۲).

در دو دهه‌ی اخیر، شواهد قابل توجهی وجود دارد مبنی بر این که در بیماران مبتلا به افسردگی حاد، تغییراتی در عملکرد نورون‌های سروتونرژیک در سیستم اعصاب مرکزی به وقوع می‌پیوندد (۳۳). با تحقیقات انجام شده، که بیانگر نقش برجسته‌ی سروتونین در تعیین و تنظیم بسیاری از رفتارها می‌باشد و نظر به این که مستندات کافی در ارتباط با تعیین اثرات امواج ELF بر آزادسازی این میانجی عصبی از هسته‌ی رافه‌ی مغز، در دست نیست و همچنین با توجه به مطالعات اشاره شده، هدف از این تحقیق، بررسی اثرات امواج ELF بر سطح متابولیت سروتونین در هسته‌ی رافه بود که به دنبال آن، استفاده از این امواج در درمان بیماران مبتلا به اختلالات سیستم سروتونرژیک، پیشنهاد می‌گردد. یکی از انواع بیماری‌هایی که در آن‌ها چنین اختلالاتی یافت می‌شود، بیماری افسردگی است.

روش‌ها

حیوانات و شرایط نگهداری

در این تحقیق از موش‌های صحرایی (Rat) نر، از نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ g-۲۰۰، استفاده شد. این حیوانات در لانه‌ی حیوانات گروه فیزیولوژی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نگهداری و تکثیر شدند. این حیوانات به صورت گروه‌های ۳تایی در قفس با آب و غذای کافی قرار گرفتند. در لانه، دمایی بین ۲۶-۲۰ °C و روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته، وجود داشت. آزمایش برای هر گروه در ساعات یکسانی از روز صورت پذیرفت. در هر گروه مورد، ۶ موش صحرایی وجود داشت.

سیستم امواج ELF

برای تولید این امواج از چند دستگاه متصل به هم استفاده شد (شکل ۱).

کویل مغناطیسی که از پیچاندن حدود ۲۵۰۰ دور سیم مسی با قطر ۱ mm، بر لوله‌ای از جنس پولیکا ساخته شد. طول کویل ۳۵/۵ cm، قطر داخلی آن ۲۴ cm و قطر خارجی آن ۲۵ cm بود. این کویل درون قفس فارادی قرار گرفت تا از القای میدان از خارج، جلوگیری شود.

فانکشن ژنراتور مدل ۱۲ Leybold didactic GMBH model S

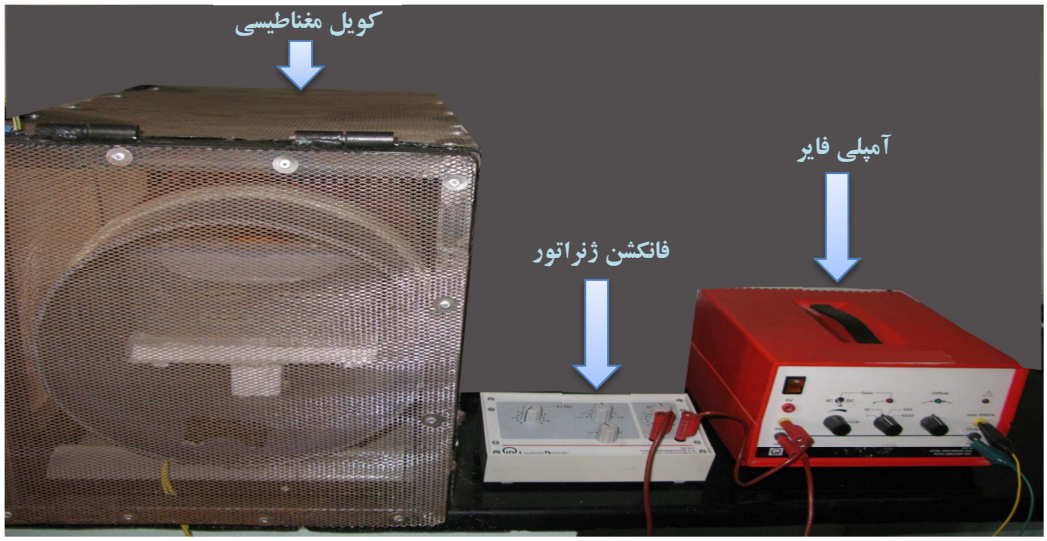
آمپلی فایر (تقویت کننده) مدل ۵۲۲.۶۱ Leybold didactic GMBH model

موش‌های صحرایی تحت امواج مغناطیسی پیوسته ی شبه سینوسی، با شدت ۷۲۰-۵۴۰ µT و فرکانس ۱۰ Hz قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری میدان مغناطیسی درون کویل، از یک تسلامتر مدل ۵۱۶.۶۲ Leybold didactic GMBH model استفاده شد. دمای درون کویل به وسیله‌ی یک دماسنج دیجیتال اندازه‌گیری شد و دما، مشابه با دمای لانه تنظیم گردید.

روش اجرای آزمایش

۱۲ عدد موش صحرایی به دو گروه ۶تایی تقسیم شدند. یکی از این گروه‌ها، گروه مورد و دیگری گروه شاهد بود.

گروه مورد، تحت امواج ELF پیوسته‌ی شبه سینوسی، ۳ ساعت در روز (بین ساعت ۸ صبح تا ۱۲ ظهر)، به مدت ۱۵ روز متوالی، قرار گرفتند. گروه شاهد نیز تحت همین شرایط بودند با این تفاوت که در مدت آزمایش، دستگاه خاموش بود و هیچ میدان مغناطیسی درون کویل وجود نداشت.



شکل ۱. سیستم امواج پیوسته‌ی متشکل از کویل مغناطیسی، فانکشن ژنراتور و آمپلی فایر. این سیستم، امواج شبه سینوسی، با شدت ۶۹۰ µT و فرکانس ۱۰ Hz در مرکز کویل ایجاد می‌کند

میکرودیالیز

پس از اتمام دوره ی پرتودهی، موش‌های صحرایی با ماده‌ی بیهوشی کلرال هیدرات (۴۵۰ mg/kg)، به صورت داخل صفاقی (IP یا Intra Protaneal) بیهوش شدند و به منظور فرایند جراحی و میکرودیالیز، درون دستگاه استریوتاکس ثابت شدند.

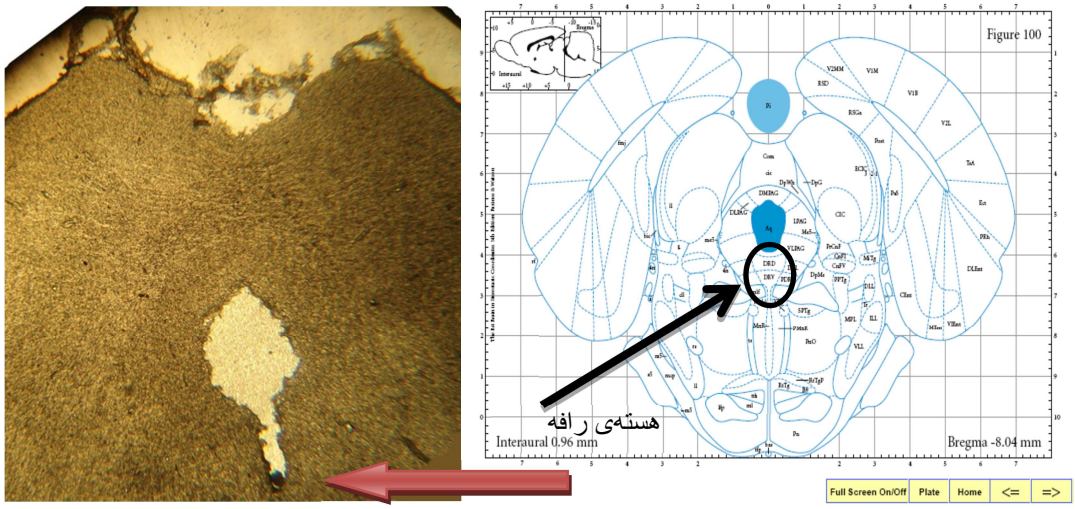
پروب میکرودیالیز (M, Eicom, Kyoto, Japan ۰۱-۱۲-A-I)، درون یک محافظ پروب (۱۲AG, Eicom, Kyoto, Japan)، قرار داده شد و در هسته‌ی رافه کاشته شد.

مشخصات هسته‌ی رافه، با مراجعه به اطلس پاکسینوز به صورت DV = -۶/۴ mm، L= ±۰/۲ mm، AP = -۸/۰۲ mm اتخاذ شد (۳۴). سپس CSF (Cerebrospinal fluid) ساختگی (۳۵)، به وسیله‌ی پمپ میکروواینجکشن (KD scientific model۱۰۰)، با سرعت ۲ µl در دقیقه، به درون پروب، پمپ شد و از خروجی پروب، نمونه‌ها جمع‌آوری شدند. هر نمونه حاصل ۲۰ دقیقه فعالیت پمپ بود. در خلال جمع‌آوری، میکروتیوب‌ها روی یخ قرار داده شدند و پس از اتمام ۲۰ دقیقه، سریع به فریزر ^{o}C ۷۰- منتقل شدند. برای هر موش صحرایی ۶ نمونه جمع‌آوری شد.

هیستولوژی

پس از اتمام نمونه‌گیری، سر از بدن موش صحرایی جدا و مغز از جمجمه خارج گردید. آن گاه مغز به مدت حداقل ۱۰ روز در فرمالین ۱۰درصد قرار گرفت تا ثابت و آماده‌ی برش‌گیری شود.

پس از ثابت شدن، مغز به وسیله‌ی فریز میکروتوم (LEICA SM ۲۰۰۰R)، به صورت کرونال، برش شد و سپس با استفاده از ژلاتین ۰/۵ درصد، روی لام چسبانده شد. پس از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری، برش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. اگر مسیر و نقطه‌ی پاره شده در برش توسط پروب صحیح بود، آن داده نگاه داشته شد، اما اگر مسیر یا نقطه اشتباه بود، داده حذف شد (شکل ۲).



شکل ۲. موقعیت هسته‌ی رافه. سمت چپ: عکس از اسلاید تهیه شده در مختصات هسته‌ی رافه، پارگی ناشی از پروب میکرودیالیز با فلش قرمز نشان داده شده است. سمت راست: اطلس پاکسینوز، برش کورونال مغز در مختصات هسته‌ی رافه

کروماتوگرافی مایع با فشار بالا

برای سنجش میزان سروتونین و متابولیت سروتونین، در نمونه‌های جمع آوری شده، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و دتکتور الکتروشیمیایی (HPLC-ECD یا High Pressure Liquid Chromatography- Electro Chemical Detector) استفاده شد.

به این ترتیب که نمونه‌ها به دستگاه، که به ستون (mm^2 ۴/۶ × ۱۵۰، ۱۲۰ ODSA، Teknokroma) و دتکتور الکتروشیمیایی (RPE, USA -۲۱۴۳ Pharmacia LKB, type) متصل بود، تزریق شدند. ولتاژ دکتور بر روی ۷۵۰+ mV تنظیم شد. مرحله‌ی متحرک (فسفات سدیم ۸/۴ g، ۱- اکتان سولفونیک اسید ۳۶۰ mg، EDTA یا Ethylenediaminetetraacetic acid به میزان ۳۰ mg و ۱۲ درصد متانول در هر لیتر آب و pH = ۳/۵)، به وسیله‌ی یک پمپ (YONGLIN SD ۹۳۰D)، با سرعت ۱ml در دقیقه، به طرف دستگاه پمپاژ می‌شد.

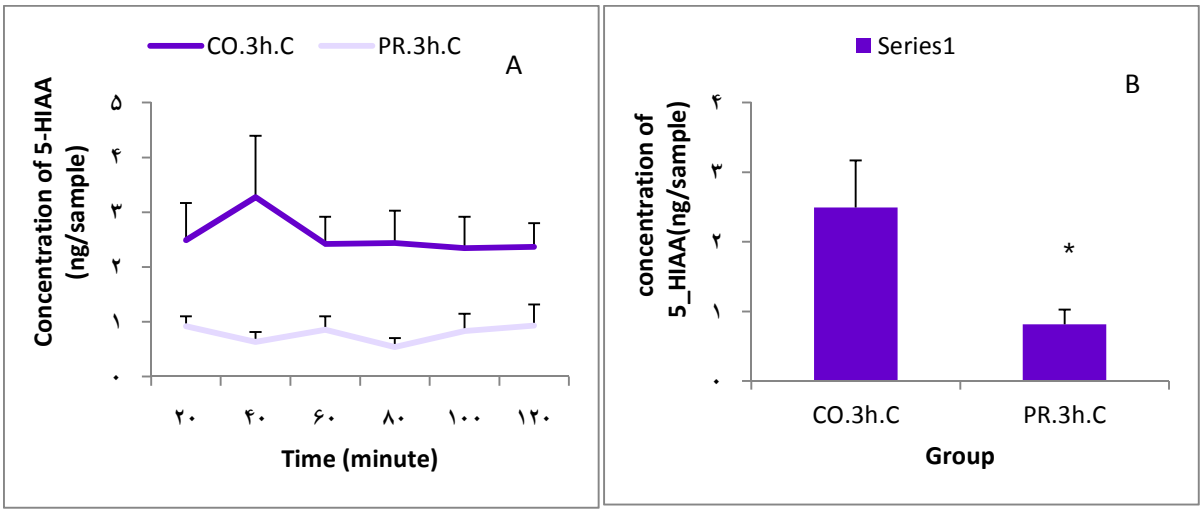
برای آنالیز پیک‌های خروجی داده‌ها، از نرم‌افزار Autochro (۳۰۰۰، USA) استفاده شد.

داده‌ها پس از جمع آوری، به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز شدند. طبیعی بودن توزیع داده‌ها، به وسیله‌ی آزمون Kolmogorov-Smirnov تأیید شد. برای مقایسه‌ی دو گروه، از آزمون t مستقل استفاده شد. در تمام تحلیل‌ها P < ۰/۰۵۰ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه، غلظت متابولیت سروتونین به عنوان شاخصی برای فعالیت سروتونرژیک، مورد ارزیابی قرار گرفت.

میانگین غلظت متابولیت سروتونین (۵-HIAA)، در هسته‌ی رافه، در گروه مورد (PR.۳h.C)، تحت امواج ELF پیوسته، به مدت ۳ ساعت در روز و طی ۱۵ روز متوالی، نسبت به گروه شاهد (CO.۳h.C)، به طور معنی‌داری کاهش یافت (P < ۰/۰۵۰) (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسه‌ی غلظت متابولیت سروتونین در هسته‌ی رافه بین گروه‌های مورد و شاهد A- مقایسه‌ی خطی B- نمودار ستونی (میانگین ± انحراف معیار، P < ۰/۰۵۰ * نسبت به گروه شاهد)

بحث

مطالعات بسیار کمی در رابطه با تأثیر امواج ELF بر غلظت سروتونین و متابولیت آن در دست است که در آن‌ها گزارش‌های متناقضی در مورد اثر امواج ELF بر غلظت سروتونین و یا متابولیت آن ارایه شده است.

برای مثال Sieron و همکاران، نشان دادند که امواج ELF، با فرکانس ۱۰ Hz و شدت ۳/۸- ۱/۸ mT و روزی یک ساعت طی ۱۴ روز متوالی، تأثیر معنی‌داری بر غلظت سروتونین و متابولیت آن، در قشر پیشانی و تنه‌ی جسم مخطط (corpus striatum and frontal cortex) نداشته است (۳۶). Zhang و همکاران، نشان دادند که میدان مغناطیسی با شدت ۰/۰۰۵ T و فرکانس ۱۲- ۴ Hz، به مدت ۴۵ دقیقه، بر روی رهایش سروتونین، در هسته‌ی رافه تأثیر داشته و سروتونین به طور معنی‌داری افزایش یافته است (۳۷).

در مطالعه‌ی دیگری، امواج ELF با فرکانس ۵۵/۶ Hz و شدت ۸/۱ mT، به مدت یک ساعت در روز و طی ۴ روز متوالی، باعث افزایش معنی‌دار سروتونین در هیپوتالاموس مغز موش صحرایی شده است؛ اما همین میدان پس از ۱۴ روز متوالی تأثیری بر سروتونین نداشته است (۱۸). Wilson در مطالعاتش بیان می‌کند که تابش مداوم امواج الکتریکی و مغناطیسی ELF، غلظت سروتونین را کم می‌کند و حتی باعث برخی اختلالات عصبی می‌شود؛ حتی در برخی مواقع افسردگی را تشدید می‌کند (۳۸).

مطالعه‌ی Sieron و همکاران (۳۶) شبیه‌ترین مطالعه‌ی موجود بود که در آن، غلظت متابولیت به صورت غیر معنی‌داری افزایش داشت؛ اما در مطالعه‌ی حاضر به طور معنی‌داری کاهش داشت. این نتایج متناقض در مطالعات مختلف، می‌تواند به این علت باشد که هر کدام از مطالعات در شرایط متفاوتی انجام شده است و شدت‌های متفاوت، فرکانس‌های متفاوت، زمان تحت امواج قرار گرفتن و حاد یا مداوم بودن، اثرات بسیار متفاوتی بر روی بیولوژی خواهد داشت که در این خصوص، اطلاعات کامل و برجسته‌ای در دست نیست.

غلظت متابولیت سروتونین، در واقع شاخصی از فعالیت سیستم سروتونرژیک است و کاهش سطح متابولیت سروتونین در مغز، معلول چند علت است. به طور کلی، سطح متابولیت سروتونین در مغز می‌تواند شاخصی از رهایش سروتونین در فضای سیناپسی، بازجذب آن توسط سلول‌های پیش سیناپسی (۳۹) و یا فعالیت MAO، باشد (۴۰).

بنابراین کاهش سطح متابولیت سروتونین، معلول یکی از علت‌های زیر است: کاهش فعالیت MAO، کاهش رهایش سروتونین در فضای سیناپسی، افزایش بازجذب سروتونین توسط نورون‌های پیش سیناپسی.

کاهش فعالیت MAO، خود دلیلی برای افزایش سطح سروتونین در فضای سیناپسی و راهی برای درمان افسردگی است. دو علت دیگر، باعث کم شدن سروتونین در فضای سیناپسی می‌شوند که این باعث ایجاد افسردگی و یا تشدید آن خواهد شد؛ چرا که یکی از دلایل افسردگی، پایین بودن میزان سروتونین، در فضای سیناپسی است (۴۱).

اگر علت اصلی پایین آمدن سطح متابولیت سروتونین، کاهش فعالیت MAO باشد، می‌توان از امواج ELF برای درمان افسردگی استفاده کرد.

اما اگر علت آن، کاهش رهایش سروتونین در فضای سیناپسی و یا افزایش بازجذب سروتونین توسط نورون های پیش سیناپسی باشد، می‌توان گفت شاید امواج ELF باعث ایجاد افسردگی و یا تشدید آن شود. اما در پاره‌ای از اختلالات روانی مانند سندرم سروتونین، مقدار سروتونین، افزایش بیش از اندازه‌ای دارد. امواج ELF می‌تواند درمانی در این گونه بیماری‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از پشتیبانی مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، همچنین از آزمایشگاه کنترل کیفیت کارخانه ی داروپخش به جهت زحمات فراوان ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از زحمات تمامی دوستان به ویژه ی آقای مهندس نوری و خانم دکتر راداحمدی کمال قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Xu F, Gao M, Wang L, Jin L. Study on the effect of electromagnetic impulse on neurotransmitter metabolism in nerve cells by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection coupled with microdialysis. Anal Biochem 2002; 307(1): 33-9.
2. Habash RWY. Bioeffects and therapeutic applications of electromagnetic energy. CRC Press; 2008.
3. Hoffmann K, Bagorda F, Stevenson AF, Teuchert-Noodt G. Electromagnetic exposure effects the hippocampal dentate cell proliferation in gerbils (Meriones unguiculatus). Indian J Exp Biol 2001; 39(12): 1220-6.
4. Kato M. Electromagnetics in biology. New York, NY: Springer; 2006.
5. Savitz DA, John EM, Kleckner RC. Magnetic field exposure from electric appliances and childhood cancer. Am J Epidemiol 1990; 131(5): 763-73.
6. Yaguchi H, Yoshida M, Ding GR, Shingu K, Miyakoshi J. Increased chromatid-type chromosomal aberrations in mouse m5S cells exposed to power-line frequency magnetic fields. Int J Radiat Biol 2000; 76(12): 1677-84.
7. Kwee S, Raskmark P. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 1. ELF electromagnetic fields. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 1995; 36(2): 109-14.
8. Miyakoshi J, Ohtsu S, Shibata T, Takebe H. Exposure to magnetic field (5 mT at 60 Hz) does not affect cell growth and c-myc gene expression. J Radiat Res 1996; 37(3): 185-91.
9. Lindstrom E, Lindstrom P, Berglund A, Mild KH, Lundgren E. Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. J Cell Physiol 1993; 156(2): 395-8.
10. Levin ED. Psychopharmacological effects in the radial-arm maze. Neurosci Biobehav Rev 1988; 12(2): 169-75.
11. Song B, Zhao M, Forrester J, McCaig C. Nerve regeneration and wound healing are stimulated and directed by an endogenous electrical field in vivo. J Cell Sci 2004; 117(Pt 20): 4681-90.
12. Wilson BW, Anderson LE, Hilton DI, Phillips RD. Chronic exposure to 60-Hz electric fields: effects on pineal function in the rat. Bioelectromagnetics 1981; 2(4): 371-80.
13. Wilson BW, Matt KS, Morris JE, Sasser LB, Miller DL, Anderson LE. Effects of 60 Hz magnetic field exposure on the pineal and hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the Siberian hamster (Phodopus sungorus). Bioelectromagnetics 1999; 20(4): 224-32.
14. Huuskonen H, Saastamoinen V, Komulainen H, Laitinen J, Juutilainen J. Effects of low-frequency magnetic fields on implantation in rats. Reprod Toxicol 2001; 15(1): 49-59.
15. McLeod KJ, Collazo L. Suppression of a differentiation response in MC-3T3-E1 osteoblast-like cells by sustained, low-level, 30 Hz magnetic-field exposure. Radiat Res 2000; 153(5 Pt 2): 706-14.
16. Korneva HA, Grigoriev VA, Isaeva EN, Kaloshina SM, Barnes FS. Effects of low-level 50 Hz magnetic fields on the level of host defense and on spleen colony formation. Bioelectromagnetics 1999; 20(1): 57-63.
17. Bell GB, Marino AA, Chesson AL. Alterations in brain electrical activity caused by magnetic fields: detecting the detection process. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1992; 83(6): 389-97.
18. Bao X, Shi Y, Huo X, Song T. A possible

involvement of beta-endorphin, substance P, and serotonin in rat analgesia induced by extremely low frequency magnetic field. Bioelectromagnetics 2006; 27(6): 467-72.
19. Lai H, Carino M. 60 Hz magnetic fields and central cholinergic activity: effects of exposure intensity and duration. Bioelectromagnetics 1999; 20(5): 284-9.
20. Canedo L, Cantu RG, Hernandez R. Magnetic field exposure during gestation: pineal and cerebral cortex serotonin in the rat. Int J Dev Neurosci 2003; 21(5): 263-6.
21. Pipitone N, Scott DL. Magnetic pulse treatment for knee osteoarthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. Curr Med Res Opin 2001; 17(3): 190-6.
22. Riva SE, Vannini A, Castellacci P. Therapeutic effects of pulsed magnetic fields on joint diseases. Panminerva Med 1992; 34(4): 187-96.
23. Marks RA. Spine fusion for discogenic low back pain: outcomes in patients treated with or without pulsed electromagnetic field stimulation. Adv Ther 2000; 17(2): 57-67.
24. Ravaghi H, Flemming K, Cullum N, Olyaee MA. Electromagnetic therapy for treating venous leg ulcers. Cochrane Database Syst Rev 2006; (2): CD002933.
25. Jorgensen WA, Frome BM, Wallach C. Electrochemical therapy of pelvic pain: effects of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on tissue trauma. Eur J Surg Suppl 1994; (574): 83-6.
26. Sisken BF, Jacob JM, Walker JL. Acute treatment with pulsed electromagnetic fields and its effect on fast axonal transport in normal and regenerating nerve. J Neurosci Res 1995; 42(5): 692-9.
27. Richards TL, Lappin MS, Acosta-Urquidi J, Kraft GH, Heide AC, Lawrie FW, et al. Double-blind study of pulsing magnetic field effects on multiple sclerosis. J Altern Complement Med 1997; 3(1): 21-9.
28. Sandyk R, Iacono RP. Reversal of micrographia in Parkinson's disease by application of picoTesla range magnetic fields. Int J Neurosci 1994; 77(1-2): 77-84.
29. Shupak NM, Prato FS, Thomas AW. Therapeutic uses of pulsed magnetic field exposure: A review. Radio Science Bulletin 2003; 307: 9-32.
30. Petersen NT, Pyndt HS, Nielsen JB. Investigating human motor control by transcranial magnetic stimulation. Exp Brain Res 2003; 152(1): 1-16.
31. Barrett KM, Barman SM, Boitano S, Brooks H. Ganong's review of medical physiology. 24th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2012.
32. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. Annu Rev Med 2009; 60: 355-66.
33. Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. Clin Chem 1994; 40(2): 288-95.
34. Paxinos G, Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego, CA: Elsevier ; 2004.
35. Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. Microdialysis in rodents. Curr Protoc Neurosci 2009; Chapter 7: Unit7. 2.
36. Sieron A, Labus L, Nowak P, Cieslar G, Brus H, Durczok A, et al. Alternating extremely low frequency magnetic field increases turnover of dopamine and serotonin in rat frontal cortex. Bioelectromagnetics 2004; 25(6): 426-30.
37. Zhang J, Wang X, Wang M. Influence of time-varying magnetic field on the release of neurotransmitters in raphe nuclei of rats. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2005; 6: 6214-6.
38. Wilson BW. Chronic exposure to ELF fields may induce depression. Bioelectromagnetics 1988; 9(2): 195-205.
39. Reinhard JF, Jr., Wurtman RJ. Relation between brain 5-HIAA levels and the release of serotonin into brain synapses. Life Sci 1977; 21(12): 1741-6.
40. Wolf WA, Youdim MB, Kuhn DM. Does brain 5-HIAA indicate serotonin release or monoamine oxidase activity? Eur J Pharmacol 1985; 109(3): 381-7.
41. Squire LR, Berg D, Bloom F, du Lac S, Ghosh A. Fundamental neuroscience. 3rd ed. Burlington, MA: Academic Press; 2008.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 30.05.2014
Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014
Accepted: 08.09.2014

The Effect of Extremely Low-Frequency Magnetic Fields on the Level of Serotonin Metabolite in the Raphe Nuclei of Adult Male Rat

Daryoush Shahbazi PhD[1], Leila Shiri[2], Hojatollah Alaei PhD[3], Naser Naghdi PhD[4], Saeid Kermani PhD[5], Hossein Afrouzi MSc[6], Ali Kiani MSc[7], Mojtaba Akbari MSc[8]

Short Communication

Abstract

Background: According to several studies, the extremely low-frequency magnetic fields (ELF fields) affect extensively on biological system. These fields can influence the nervous and neurotransmitter system due to the electrical nature of them. The influences in some cases are therapeutic and sometimes are destructive. The purpose of this study was to investigate the effect of extremely low-frequency magnetic fields, with frequency of 10 Hz and intensity of 720 to 540 microtesla, on the level of serotonin metabolite, 5-Hydroxyindoleacetic Acid (5-HIAA), in the raphe nuclei of adult male rat.

Methods: Using a magnetic coil, the extremely low-frequency magnetic field, with 690 microtesla strength at the center of the coil, was produced. 6 rats were under this field 3 hours daily for 15 consecutive days. Then, 6 samples were collected from the raphe nucleus of each rat using microdialysis technique. Each sample was 40 microliters in volume. Then, the serotonin metabolite levels in each sample were measured via high-pressure liquid chromatography and compared with its control sample.

Findings: Extremely low-frequency magnetic field with mentioned characteristics significantly decreased the level of serotonin metabolite in the raphe nucleus compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: It can be concluded that extremely low-frequency magnetic fields affect the serotonergic system and can be used to treat some diseases.

Keywords: Electromagnetic fields, Hydroxyindoleacetic acid, Microdialysis, High-pressure liquid chromatography, Raphe nuclei

Citation: Shahbazi D, Shiri L, Alaei H, Naghdi N, Kermani S, Afrouzi H, et al. **The Effect of Extremely Low-Frequency Magnetic Fields on the Level of Serotonin Metabolite in the Raphe Nuclei of Adult Male Rat.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): 1354-62

* This paper is derived from a MSc thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Professor, Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- MSc Student, Department of Biomedical Engineering, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6- PhD Student, Department of Chemistry, School of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran
7- PhD Student, Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
8- PhD Student, Department of Epidemiology, School of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Corresponding Author: Leila Shiri, Email: shiri33@gmail.com

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

a. **Article**: Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. Brain Res. 2002;935(1-2):40-6.
b. **Chapter in a book**: Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
c. **Book**: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

14. **Proof Reading:** A computer 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. 298, 3rd week, October 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.