

### مقاله های پژوهشی

- ۱۶۳۳ ..... بررسی تأثیر سلول های بنیادی پالپ دندان شیری انسانی بر سلول های توموری K562 در شرایط هم کشتی .....  
 منا گرجی، دکتر بتول هاشمی بنی، دکتر حمید بهرامیان، دکتر حسین صالحی، راضیه علی پور، مریم علی اکبری
- ۱۶۴۶ ..... اثر ضد قارچی اسانس گیاه خوشاریزه (Echinophora platyloba) بر گونه های کاندیدیایی جدا شده از واژینیت کاندیدیایی در مقایسه با فلو کونازول .....  
 نوید امینیان، دکتر پروین دهقان، دکتر مصطفی چادگان پور، دکتر ابراهیم سجادی، مریم یزدی
- ۱۶۵۹ ..... تشخیص کاندیدیازیس واژینال با استفاده از استخراج اتوماتیک قارچ کاندیدا در تصاویر مربوط به نمونه های پاپ اسمیر ...  
 محمدرضا مؤمن زاده، دکتر اردشیر طالبی، دکتر علیرضا مهری دهنوی، دکتر حسین ربانی

### مقاله مروری

- ۱۶۶۸ ..... اینفلامازوم و نقش آنها در بیماری ها .....  
 امین توسلی، دکتر علیرضا حق پرست

### مقاله کوتاه

- ۱۶۹۰ ..... بررسی میزان فراوانی استافیلوکوکوس های اورئوس جدا شده از سواب بینی کودکان مهدهای کودکک اصفهان ..  
 دکتر حمید رحیمی، دکتر مژگان لقماتی، پریسا شعاعی، رامین دیباج، دکتر بهروز عطایی، عباس داعی ناصر، دکتر حسن شجاعی

### Original Articles

- The Effects of Coculture of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) on K562 Tumor Cells ..... 1645  
 Mona Gorji, Batoul Hashemibeni PhD, Hamid Bahramian PhD, Hosein Salehi PhD, Razieh Alipour MSc, Maryam Aliakbari
- Antifungal Effect of Echinophora Platyloba Essence against the Candida Species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis, Compared with Fluconazole ..... 1658  
 Navid Aminian MSc, Parvin Dehghan PhD, Mostafa Chadeganipour PhD, Ebrahim Sajadi PhD, Maryam Yazdi MSc
- Diagnosis of Vulvovaginal Candidiasis via Automatic Extraction of Candida Fungus from Pap Smear Images ... 1667  
 Mohammadreza Momenzadeh, Ardeshir Talebi MD, Alireza Mehri-Dehnavi PhD, Hossein Rabbani PhD

### Review Article

- Inflammasomes and Their Role in Diseases ..... 1689  
 Amin Tavassoli MSc, Alireza Haghparast DVM, PhD

### Short Communication

- A Study on Frequency of Nasal Staphylococcus Aureus Colonization in Children from Kindergartens in Isfahan City, Iran ..... 1697  
 Hamid Rahimi MD, Mojgan Loghmani MD, Parisa Shoaie MSc, Ramin Dibaj MSc, Behrouz Ataei MD, Abbas Daei Naser, Hasan Shojaei PhD



## مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۳۰۴)، هفته اول آذر ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

---

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

---

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

---

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

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

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

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

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

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

## راهنمای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

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

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

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

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

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

#### **اگر منبع مورد نظر مقاله است:**

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

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

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

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

#### **اگر منبع مورد نظر کتاب است:**

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

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

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

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

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

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

۱۵- **نمونه‌خوانی (Proofreading):** یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده 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 عبارات‌های مخفف در عنوان و خلاصه مقاله خودداری گردد.

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

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

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

## فهرست مطالب

### مقاله‌های پژوهشی

- ۱۶۳۳..... بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی پالپ دندان شیری انسانی بر سلول‌های توموری K562 در شرایط هم‌کشتی.....  
منا گرجی، دکتر بتول هاشمی بنی، دکتر حمید بهرامیان، دکتر حسین صالحی، راضیه علی‌پور، مریم علی‌اکبری
- ۱۶۴۶..... اثر ضد قارچی اسانس گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba*) بر گونه‌های کاندیدایی جدا شده از واژینیت کاندیدایی در مقایسه با فلوکونازول.....  
نوید امینیان، دکتر پروین دهقان، دکتر مصطفی چادگان‌پور، دکتر ابراهیم سجادی، مریم یزدی
- ۱۶۵۹..... تشخیص کاندیدیازیس واژینال با استفاده از استخراج اتوماتیک قارچ کاندیدا در تصاویر مربوط به نمونه‌های پاپ اسمیر.....  
محمد رضا مؤمن‌زاده، دکتر اردشیر طالبی، دکتر علیرضا مهری دهنوی، دکتر حسین ربانی

### مقاله مروری

- ۱۶۶۸..... اینفلمازوم و نقش آنها در بیماری‌ها.....  
امین توسلی، دکتر علیرضا حق‌پرست

### مقاله کوتاه

- ۱۶۹۰..... بررسی میزان فراوانی استافیلوکوکوس‌های اورئوس جدا شده از سواب بینی کودکان مهدهای کودک اصفهان.....  
دکتر حمید رحیمی، دکتر مژگان لقمانی، پریسا شعاعی، رامین دیباج، دکتر بهروز عطایی، عباس داعی ناصر، دکتر حسن شجاعی

## بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی پالپ دندان شیری انسانی بر سلول‌های توموری K۵۶۲ در شرایط هم‌کشتی

منا گرجی<sup>۱</sup>، دکتر بتول هاشمی بنی<sup>۲</sup>، دکتر حمید بهرامیان<sup>۳</sup>، دکتر حسین صالحی<sup>۴</sup>، راضیه علی‌پور<sup>۵</sup>،  
مریم علی اکبری<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** به دلیل افزایش میزان سرطان در جوامع انسانی، دانشمندان روش‌های گوناگونی از قبیل شیمی درمانی و دارو درمانی را جهت مبارزه با سرطان به کار گرفته‌اند، اما این روش‌ها به دلیل عود مکرر و مقاومت دارویی به صورت کامل جوابگو نیست. به همین دلیل، در سال‌های اخیر علاوه بر روش‌های دیگر، سلول درمانی نیز در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. از آن جا که در بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی بر سلول‌های توموری نتایج متناقضی به دست آمده است، این مطالعه با هدف بررسی میزان تکثیر و بقای رده‌ی سلولی سرطانی K۵۶۲ در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی پالپ دندان شیری انجام شد.

**روش‌ها:** سلول‌های بنیادی حاصل از پالپ دندان‌های شیری افتاده، از دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و سلول‌های K۵۶۲ از انستیتو پاستور تهیه و کشت داده شد. هم‌کشتی مستقیم سلول‌های بنیادی با K۵۶۲ در زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت با نسبت سلولی ۱ به ۱۰، ۱ به ۱ و ۱ به ۱ صورت پذیرفت. لازم به ذکر است تعداد سلول‌های توموری در تمام گروه‌های آزمایشی یکسان انتخاب گردید. بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌های توموری، با روش‌های رنگ آمیزی تریپان بلو و [MTT] [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] انجام گرفت.

**یافته‌ها:** مقایسه‌ی نتایج MTT در گروه‌های مختلف پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت هم‌کشتی، نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، میانگین تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت. در گروه اول که نسبت سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان ۱۰ برابر سلول‌های K۵۶۲ بود، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی حداقل (Optical density = ۰/۶) و در گروه سوم که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان با دانسیته‌ی ۰/۱ سلول‌های K۵۶۲ کشت داده شد، حداکثر (Optical density = ۱/۶) تکثیر سلول‌های توموری به دست آمد (P < ۰/۰۵۰). نتایج شمارش سلولی با رنگ‌آمیزی تریپان بلو، مطابق نتایج پیش‌گفته بود.

**نتیجه‌گیری:** در شرایط هم‌کشتی، افزایش نسبت سلول‌های بنیادی به سلول‌های سرطانی K۵۶۲ بر روند تکثیر سلول‌های K۵۶۲ تأثیر بازدارندگی دارد.

**واژگان کلیدی:** سلول بنیادی پالپ دندان، سلول‌های توموری K۵۶۲، هم‌کشتی

**ارجاع:** گرجی منا، هاشمی بنی بتول، بهرامیان حمید، صالحی حسین، علی‌پور راضیه، علی اکبری مریم. بررسی بقا و تکثیر سلول‌های K۵۶۲

تحت تأثیر هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۴): ۱۶۴۵-۱۶۳۳

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

۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۵- گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.



## مقدمه

سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌هایی تعریف شده‌اند که توانایی خودنوزایی (Self-renewal) و پتانسیل تمایز (Multi potent) را دارند و می‌توانند به سلول‌های دختری و به انواع سلول‌های بالغ تبدیل شوند (۱-۲). به طور کلی، خصوصیات سلول‌های بنیادی عبارت از توانایی چسبیدن به ظرف و داشتن شکل شبه فیبروبلاستی در محیط کشت، داشتن قابلیت خودنوزایی و توانایی تمایز به سلول‌های بافت‌های مزانشیمی (استخوان، غضروف و بافت چربی)، عدم بیان نشانگرهای مربوط به رده‌ی همپوپیتیک (CD۱۹، CD۴۵، CD۳۴، CD۱۴) و CD۱۱b) و بیان بعضی از نشانگرها مانند CD۴۴، CD۷۳، (Thy-۱) CD۹۰ و CD۱۰۵ است (۳-۵).

در سال‌های اخیر نیز وجود نشانگرهای سلول‌های بنیادی بر روی SHED مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که SHEDها خواص سلول‌های بنیادی را دارند.

دندان و سلول‌های اطراف ریشه، دارای انواع سلول‌های بنیادی هستند که تا کنون چند نوع آن شناسایی شده‌اند که عبارت از DPSC (Dental pulp stem cells)، SHED (Stem cells from exfoliated deciduous teeth)، PDLSC (Stem cells from apical papilla) SCAP (Periodontal ligament stem cells) و DFPC (Dental follicle progenitor cells) می‌باشند.

سلول‌های بنیادی دندان شیری (SHED) یا (Stem cell from human exfoliated deciduous teeth) در انسان توسط Huang و همکاران معرفی گردید. این سلول‌های اکتومزانشیمی هتروژنوس با خاصیت

خودنوزایی و تمایز Multi-lineage هستند (۶). Petrovic و Stefanovic بیان کردند که سلول‌های SHED در حین تکثیر به صورت سلول‌های کروی و خوشه‌ای در می‌آیند. این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان و بافت چربی، کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند و اکثر مطالعات بر روی آن‌ها نیز در زمینه‌ی طب ترمیمی و مهندسی بافت به ویژه بافت‌های دندانی بوده است (۷).

از آن جا که ابتلا به انواع سرطان‌ها و تومورها یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی بشر امروز و عامل ۱۳ درصد مرگ‌ها است، تصور استفاده از سلول‌های بنیادی شگفت‌انگیز در درمان انواع سرطان‌ها، از همان اوایل شناخت سلول‌های بنیادی، مورد توجه بوده است (۸).

خصوصیت لانه‌گزینی و تجمع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اطراف بافت توموری موجب شده است که این سلول‌ها را ابزارهای مناسبی، جهت هدف قرار دادن بافت توموری و فرستادن مولکول‌های ضد توموری مانند پیش داروها (Prodrugs)، سایتوکاین‌های تحریک کننده‌ی ایمنی و ... به محل تومور بدانند. به همین دلیل، در سال‌های اخیر، آزمایش‌های متعددی در این باره طراحی و انجام شده‌اند (۹-۱۲).

Valtieri و Sorrentino بیان می‌کنند که سلول‌های بنیادی موجب مرگ سلول‌های توموری نشده و حتی باعث تبدیل سلول‌های بنیادی به سلول‌های سرطانی می‌شود و اگر تعداد سلول‌های بنیادی کم باشد، این سلول‌ها باعث ایجاد حالت متاستاتیک در تومور می‌شود (۱۱). همچنین در تحقیق دیگری، DelaRosa و Lombardo گزارش

کرده‌اند که سلول‌های بنیادی دارای خاصیت ضد ایمنی هستند و قادرند با ترشح عواملی از تکثیر و عملکرد لنفوسیت‌ها جلوگیری کنند (۱۲).

Shi و همکاران بیان کرده‌اند که سلول‌های بنیادی می‌توانند به محل تومور مهاجرت کنند و سلول‌های بنیادی به همراه IFN- $\gamma$  (Interferon gamma), IL- $\alpha$ , (Interleukin alpha) و IL- $\beta$  (Interleukin beta) باعث القای خاصیت ضد ایمنی می‌شوند (۱۳).

به تازگی در انسان و بابون دیده شده است که هم‌کشتی سلول‌های بنیادی و لنفوسیت‌ها باعث بروز خاصیت سرکوب ایمنی شده و تولید سایتوکاین‌ها نیز تعدیل گردیده است (۱۴-۱۶).

Frank و همکاران در تحقیق نشان دادند که قادرند به محل تومور مهاجرت کنند و باعث ایجاد خاصیت ایمنونوزسنسی (تحریک سیستم ایمنی) شوند. در واقع، با تغییراتی در سلول‌های بنیادی، آن‌ها مولکول‌های شبه آنتی‌بادی را تولید می‌کنند که باعث ایجاد منافذ در دیواره‌ی سلول توموری می‌شوند. وقتی سلول‌های بنیادی در مجاورت سلول‌های توموری قرار می‌گیرند، می‌توانند انواع مختلفی از عوامل ضد سرطانی مثل اینترلوکین‌ها و اینترفرون‌ها را تولید کنند و حتی با تولید سایتوکاین‌ها و عوامل رشد و ماتریکس خارج سلولی، باعث پسرقت تومور و آپوپتوز سلول‌های توموری می‌شوند (۱۷). همچنین سلول‌های بنیادی تکثیر سلول‌های توموری را کاهش می‌دهند و چرخه‌ی سلولی را در سلول‌های توموری در مراحل G $_0$ -G $_1$  نگه می‌دارند و مانع پیشرفت آن می‌شوند (۶).

از طرف دیگر، به نظر می‌رسد که اثرات سلول‌های بنیادی بر سلول‌های توموری به منشأ سلول‌های بنیادی نیز بستگی دارد؛ برای مثال، در

حالی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان روی متاستاز به ریه در موش‌های مبتلا به کارسینومای متاستاتیک پستان تأثیری ندارند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف و همین‌طور بافت چربی، متاستازهای ریوی را در این موش‌ها کاهش می‌دهند (۱۸) و یا در مطالعه‌ی دیگری مشاهده شده است که تزریق زیر جلدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف و یا بافت چربی همراه با سلول‌های سرطانی، موجب کاهش و تزریق زیر جلدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان همراه با سلول‌های سرطانی، موجب افزایش توانایی متاستاتیک سلول‌های توموری شده است (۱۹).

به طور اختصاصی‌تر، در مورد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSC) یا Adipose-derived stem cells) که با تزریق زیر جلدی این سلول‌ها به منطقه‌ی تومور سرعت رشد تومور و میزان متاستاز افزایش می‌یابد (۲۰).

در مطالعه‌ی Galie و همکاران مشاهده شد که وقتی سلول ADSC در مجاورت سلول سرطانی (PC3) قرار می‌گیرد، در محدوده‌ی تومور، رگ‌زایی اتفاق می‌افتد (۲۱). در تحقیقات دیگر نشان داده شده است که هم‌کشتی سلول‌های ADSC با سلول‌های پانکراس سرطانی، باعث توقف سلول توموری در مرحله‌ی G $_1$  می‌شود و هم‌کشتی سلول‌های ADSC با سلول‌های سرطانی K562 باعث کاهش تکثیر در سلول‌های توموری می‌شود. در واقع، یک رده‌ی اریتروبلاست لکومی انسانی، غیر چسبنده، معلق و با شکل گرد است. این رده‌ی سلولی از بیماران مبتلا به CML (Chronic myeloid leukemia) به دست

می‌آید (۲۳-۲۲، ۸).

در هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف با سلول‌های K562 نیز کاهش تکثیر سلول‌های توموری و توقف تقسیم سلولی در مرحله‌ی G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> مشاهده شد (۲۴). زمانی که سلول‌های K562 با روش هم‌کشتی مستقیم و هم‌کشتی غیر مستقیم در مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان قرار می‌گیرند، باعث کاهش تکثیر سلول‌های تومور می‌شود (۲۵).

از آن جایی که دندان‌های شیری، بعد از افتادن استفاده‌ی کلینیکی خاصی ندارند و سلول‌های بنیادی موجود در آن (SHED) نسبت به سایر منابع سلول‌های بنیادی، هم با روشی بدون آسیب و درد قابل دسترسی هستند و هم از حیث هزینه، مقرون به صرفه‌تر می‌باشند؛ سلول‌های SHED را می‌توان به عنوان یک منبع مناسب در تحقیقات مختلف استفاده نمود (۶-۷).

این سلول‌ها به تازگی شناخته شده‌اند و اطلاعات به دست آمده در مورد آن‌ها، نسبت به سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و چربی کمتر است. با توجه به نتایج متناقض به دست آمده از تحقیقات مختلف در زمینه‌ی هم‌کشتی سلول‌های توموری و بنیادی و عدم وجود مطالعه مبنی بر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی دندان شیری و رده‌ی سلولی K562، در این تحقیق تأثیر هم‌کشتی سلول‌های SHED و سلول‌های توموری K562 مورد بررسی قرار گرفت.

### روش‌ها

سلول‌های K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد؛ همچنین، محیط کشت RPMI ۱۶۴۰

(Roswell Park Memorial Institute ۱۶۴۰) (Abcame) حاوی (Fetal bovine serum) FBS (Sigma) ۱۰ درصد و Penicillin/Streptomycin (Gibco) ۱ درصد فراهم گردید. به دلیل این که این سلول‌ها فاقد توانایی چسبندگی به کف فلاسک هستند، کشت به صورت سوسپانسیون انجام شد.

جهت به دست آوردن سلول‌های بنیادی از دندان شیری، پالپ دندان‌ها جدا شد و تحت شرایط استریل از دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی منتقل گردید. تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس II، پالپ دندان‌ها جدا شد و با اسکالپل به قطعات چند میلی‌متری بریده شد و جهت تجزیه‌ی بافت، آنزیم کلاژناز نوع I A (Sigma) به میزان ۱ mg/g بافت پالپ‌دندانی به کار گرفته شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷ °C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از اطمینان از تجزیه شدن کامل بافت، برابر حجم محلول آنزیم به کار رفته، محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ تهیه شده، جهت خنثی کردن فعالیت آنزیم به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید.

در ادامه‌ی کار، سوسپانسیون در لوله‌های فالكون ۱۵ ml به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ rpm سانتریفوژ شد و مایع رویی تخلیه گردید. به رسوب سلولی به دست آمده، محیط کشت FBS ۱۰ درصد و RPMI افزوده شد و در مرحله‌ی پایانی، سلول‌ها در فلاسک ۲۵ cm<sup>2</sup> در محیط کشت FBS ۱۰ درصد، RPMI، Penicillin/Streptomycin ۱ درصد در انکوباتور ۳۷ °C، CO<sub>2</sub> ۵ درصد و رطوبت نسبی ۹۰ درصد کشت داده شدند.

## هم‌کشتی سلول‌های بنیادی و توموری

بعد از به دست آوردن تعداد کافی SHED از طریق پاساژهای متوالی، دو پلیت ۱۲ خانه انتخاب و ۴ خانه‌ی اول هر پلیت یک میلیون سلول SHED در ۴ خانه‌ی بعدی ۱۰۰۰۰۰ سلول و در ۴ خانه‌ی آخر، ۱۰۰۰۰ سلول ریخته شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌های SHED به کف چاهک‌های هر پلیت، به هر کدام از ۱۲ خانه‌ی هر پلیت، ۱۰۰۰۰۰ سلول K562 اضافه شد و این گونه نسبت‌های ۱/۱۰، ۱/۱ و ۱۰/۱ با ۴ تکرار برقرار شد. پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت هم‌کشتی، میزان تکثیر و زنده بودن سلول‌ها با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و تریپان بلو بررسی شد. این مراحل، ۳ مرتبه تکرار گردید.

## روش MTT

جهت بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌ها از روش رنگ‌آمیزی MTT استفاده شد. مدیوم رویی تخلیه شد و چاهک با ۱/۵ cc PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma) شستشو داده شد و ۴۰۰  $\mu$ l مدیوم خالص و سپس ۴۰  $\mu$ l محلول MTT (Merck) با غلظت ۵ mg/ml اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوبه و تخلیه‌ی مدیوم ۴۰۰  $\mu$ l دی‌متیل سولفوکساید اضافه شد، ۲ ساعت در تاریکی ماند و سپس از هر چاهک، ۱۰۰  $\mu$ l محلول به پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و توسط دستگاه الیزا (Microplate Reader) جذب نوری (OD یا Optical density) آن در موج ۵۷۰ nm خوانده شد.

## روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو

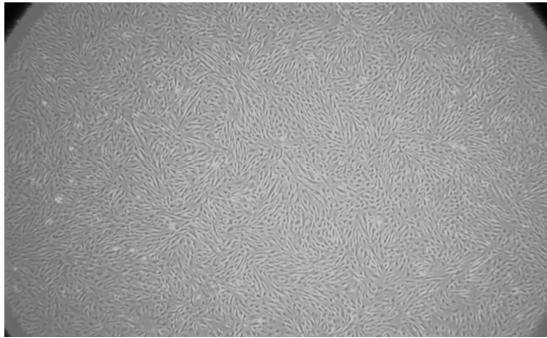
در روش تریپان بلو سوسپانسیون سلول‌های K562 به لوله‌ی فالكون منتقل گردید. پس از سانتریفوژ کردن محلول رویی خارج گردید، ۱ ml مدیوم اضافه شد و

سلول‌ها پیست گردید و به طور یکنواخت شناور شد. سپس ۱۰  $\mu$ l محلول تریپان بلو (Merck) ۰/۴ درصد با ۱۰  $\mu$ l سوسپانسیون سلولی مخلوط گردید و ۱۰  $\mu$ l از این مخلوط، به لام نئوبار منتقل شد و شمارش سلولی انجام گرفت.

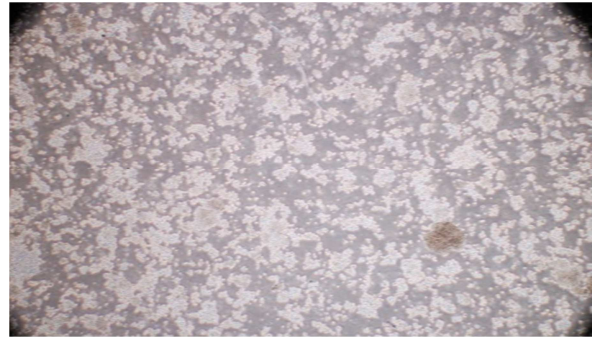
## یافته‌ها

**کشت سلولی:** در کشت سوسپانسیون سلول‌های K562، این سلول‌ها با مورفولوژی کروی بدون ایجاد زواید سلولی به حالت شناور و بدون چسبندگی به کف فلاسک مشخص بودند. در این شرایط، برخی سلول‌ها به یکدیگر چسبیده و به صورت توده‌های مجتمع دیده شدند که با پیپتینگ از هم جدا گردیدند (شکل ۱).

پس از تجزیه‌ی بافت پالپ دندان شیری انسانی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز، سلول‌های تک هسته‌ای حاصل در فلاسک‌های ۲۵ cm کشت داده شدند. ابتدا با مشاهده‌ی فلاسک‌ها در زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به حالت کروی و شناور بودند، اما با گذشت چند ساعت، به تدریج مرحله‌ی چسبندگی خود را به کف فلاسک آغاز کردند و در این زمان از حالت کروی خارج و به اشکال چند وجهی، ستاره‌ای و دوکی با زواید سیتوپلاسمی کوتاه و اندک مشخص شدند. به تدریج تحت شرایط مناسب دما ( $37^{\circ}\text{C}$ ) و  $\text{CO}_2$  ۵ درصد در انکوباتور، سلول‌ها با انجام تقسیمات میتوزی متوالی، رشد و تکثیر یافتند و پس از ۱۰-۱۲ روز، کف فلاسک را اشغال نمودند. با تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها، اشکال ستاره‌ای و چند وجهی کمتر شد و اکثر سلول‌ها دوکی شکل بودند (شکل ۲).



شکل ۲. سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان (SHED) یا (Stem cell from human exfoliated deciduous teeth) به صورت شبه فیبروبلاستی و دوکی هستند و قسمت اعظم فلاسک را اشغال کرده‌اند (× ۴۰).



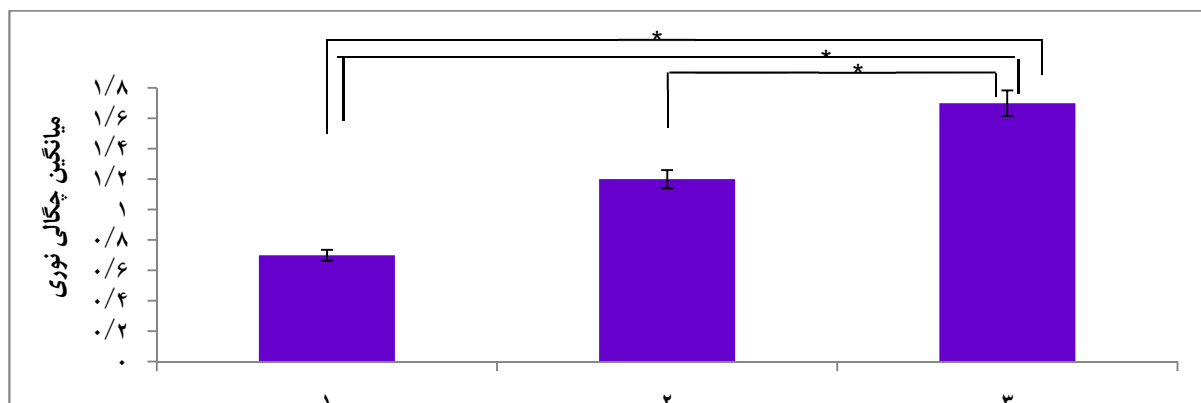
شکل ۱. در تصویر میکروسکوپ اینورت سلول‌های K562 در کشت سوسپانسیونی به صورت معلق، کروی و شبه‌کلونی مشخص می‌باشند (× ۴۰).

تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت. در گروه اول که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان ۱۰ برابر سلول‌های K562 بود، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی حداقل و در گروه سوم که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان ۰/۱ سلول‌های K562 بود، حداکثر تکثیر سلول‌های توموری مشاهده گردید. پس از مقایسه‌ی این دو گروه با یکدیگر، اختلاف معنی‌داری به دست آمد ( $P \leq 0/050$ ) (اشکال ۳ و ۴).

### نتایج رنگ‌آمیزی MTT و تریپان بلو: پس از

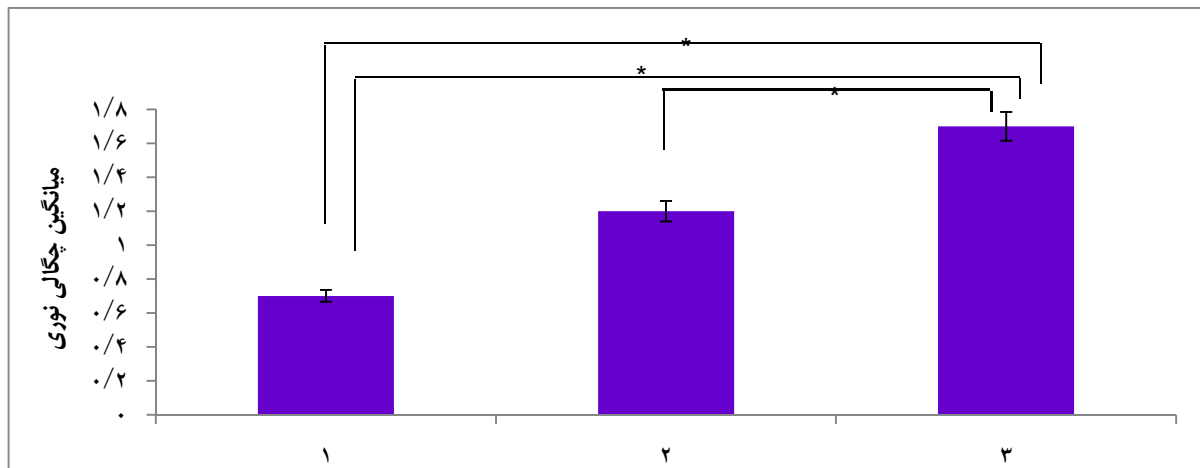
هم‌کشتی سلول‌های بنیادی پالپ دندان و توموری K562 با نسبت‌های سلولی مختلف در دو زمان، میزان تکثیر و بقای نمونه‌های مورد آزمایش از طریق روش‌های MTT مقایسه گردید.

مقایسه‌ی نتایج MTT در گروه‌های مختلف پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت هم‌کشتی نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری میانگین



شکل ۳. میزان تکثیر سلول‌های توموری رده‌ی K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۴۸ ساعت که با روش MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی گردید. نتایج نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، میانگین تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت ( $P \leq 0/050$ ).

در گروه ۱ تعداد سلول‌های بنیادی ۱۰ برابر سلول‌های توموری، در گروه ۲ تعداد سلول‌های بنیادی برابر با سلول‌های توموری و در گروه ۳ تعداد سلول‌های بنیادی ۰/۱ سلول‌های توموری بود.



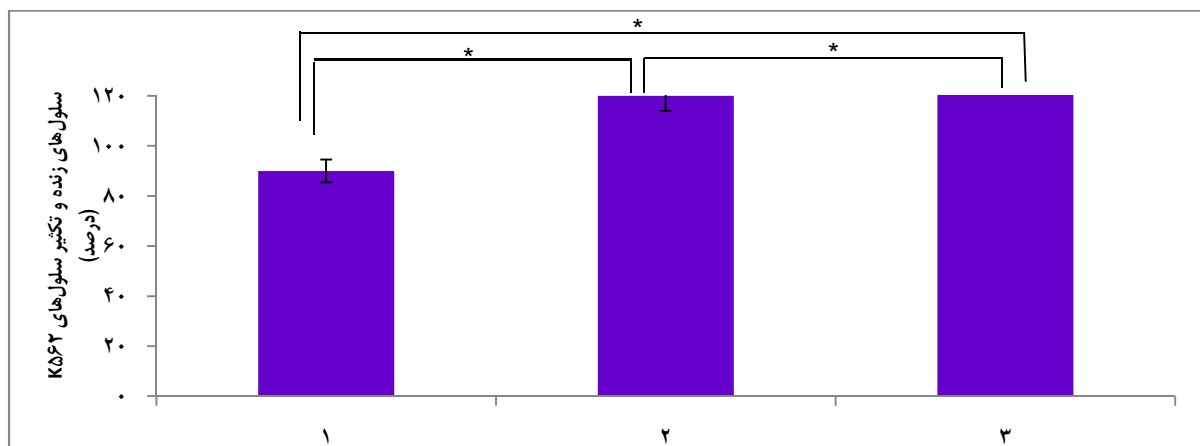
شکل ۴. میزان تکثیر سلول‌های توموری رده‌ی K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۹۶ ساعت که با روش MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی گردید. نتایج نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، میانگین تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت ( $P \leq 0.05$ ).

در گروه ۱ تعداد سلول‌های بنیادی ۱۰ برابر سلول‌های توموری، در گروه ۲ تعداد سلول‌های بنیادی برابر با سلول‌های توموری و در گروه ۳ تعداد سلول‌های بنیادی ۱/۱ سلول‌های توموری بود.

بود و در نسبت سلولی ۱۰ برابر سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان در مقایسه با سلول‌های K562، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه‌های دیگر کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P \leq 0.05$ ) (اشکال ۵ و ۶).

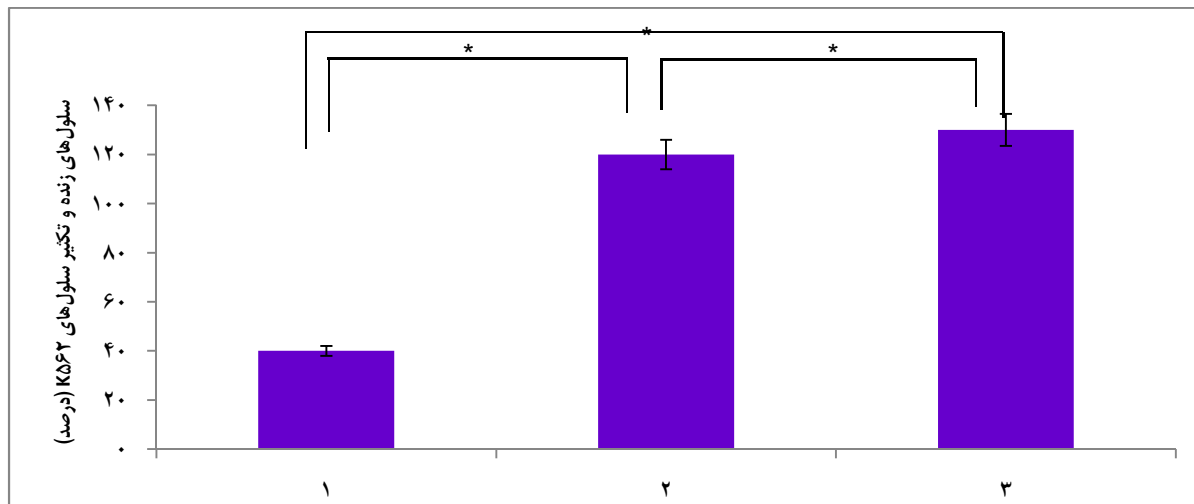
#### نتایج رنگ‌آمیزی تریپان بلو: نتایج شمارش

سلول‌های زنده پس از هم‌کشتی سلول‌های بنیادی پالپ دندان و توموری K562 با نسبت‌های سلولی مختلف در دو زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت مطابق با نتایج روش MTT



شکل ۵. درصد سلول‌های زنده و تکثیر سلول‌های K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۴۸ ساعت که از طریق روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو بررسی گردید. با افزایش سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، درصد سلول‌های زنده‌ی توموری کاهش نشان داد و میزان تکثیر در تمام گروه‌ها در مقایسه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشته است ( $P \leq 0.05$ ). گروه اول با نسبت ۱ به ۱۰ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)؛ گروه دوم با نسبت ۱ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)؛

گروه سوم با نسبت ۱۰ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)



شکل ۶. درصد سلول‌های زنده و تکثیر سلول‌های K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۹۶ ساعت که از طریق روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو بررسی گردید. با افزایش سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، درصد سلول‌های زنده توموری کاهش نشان داد و میزان تکثیر در تمام گروه‌ها در مقایسه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشت ( $P \leq 0.05$ ). گروه اول با نسبت ۱ به ۱۰ (سلول‌های

K562 به سلول‌های بنیادی): گروه دوم با نسبت ۱ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)

گروه سوم با نسبت ۱۰ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)

بار از مغز استخوان جداسازی شدند، اما تحقیقات بعدی، وجود آن‌ها را در بسیاری از بافت‌های بالغین شامل بافت چربی، خون محیطی، بافت پیوندی ماهیچه‌ها، پالپ دندان و همچنین در بافت‌های جنینی مانند ریه و طحال جنینی، خون بند ناف، مایع آمنیوتیک و جفت به خوبی نشان داد. این سلول‌ها دارای پتانسیل‌های تمایز یافتگی و ویژگی‌های ایمونولوژیک و ترمیم هستند (۳۰-۲۹، ۱۹، ۳). نکته‌ی مهمی که در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از بافت‌های مختلف باید مد نظر باشد، این است که اگر چه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر ویژگی‌های کلی شبیه هم هستند، اما به طور دقیق مانند یکدیگر رفتار نمی‌کنند و تفاوت‌هایی نیز در قدرت تکثیر، توانایی سرکوب ایمنی و توانایی تمایز به بافت‌های مختلف با هم را دارند (۱۹). از مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بنیادی، توانایی آن‌ها در

### بحث

سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌هایی تعریف شده‌اند که توانایی خودنوزایی (Self-renewal) و پتانسیل تمایز (Multi potent) را دارند که می‌توانند به سلول‌های دختری و به انواع سلول‌های بالغ تبدیل شوند (۱-۲) و به طور کامل بقای خود را حفظ کنند و حتی دچار آتروفی و هاپیر پلازی زودرس نیز نمی‌شوند (۲۶). این سلول‌ها به عنوان منبع سلولی احتمالی برای تمام بافت‌ها، به علت توانایی در تمایز به هر نوع سلولی، پتانسیل درمانی زیادی دارند (۲۷). به طور کلی، سلول‌های بنیادی بر اساس قدرت تمایز و درجه ی خودنوزایی تقسیم‌بندی می‌شوند. بر اساس منشأ، حداقل دو دسته سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic stem cell) و بالغ (Adult) وجود دارند (۲۸-۲۹). هر چند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین



را ترشح و خاصیت پیش بقا (Pro-survival) را از خود نشان دادند، اما سلول‌های MSC (Mesenchymal stem cells) بر روی گلیوبلاستوما اثر بازدارنده داشتند. آن‌ها پیشنهاد کردند که تمام نتایج بستگی به پاسخ سلول توموری به عوامل ترشح شده‌ی پاراکرینی از MSC دارد که منجر به فعالیت‌های دینامیک و واکنش‌های معکوس بین سلول‌های توموری بدخیم و استروما می‌شود (۳۴).

Suchanek و همکاران بیان کردند که در زمان طولانی مدت کشت، سلول‌های SHED علایمی از دژنره شدن و تخریب و تمایز خود به خودی از خود نشان نمی‌دهند و این ویژگی، استفاده‌ی SHED را برای زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت مناسب‌تر کرده است (۳۵). Nakamura و همکاران در محیط کشت از SHED و سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان استفاده و مشاهده نمودند که سرعت تکثیر SHED در مقایسه با سلول‌های مغز استخوان به میزان ۵۰ درصد بیشتر است. علاوه بر آن در SHED، ژن‌هایی وجود دارند که بیان بسیار بالایی دارند و در ارتباط با افزایش تکثیر سلولی و ماتریکس خارج سلولی عمل می‌نمایند (۳۶). در تحقیقی دیگر که توسط Kerkis و همکاران صورت گرفت، بیان گردید که سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان می‌توانند به سمت سرطانی شدن پیشرفت نمایند که این حالت در رابطه با سلول‌های SHED دیده نشده است (۳۷). در چند تحقیق دیگر گزارش شده است که هم‌کشتی سلول‌های ADSC (Adipose derive stem cell) با سلول‌های سرطانی K562 باعث کاهش تکثیر در سلول‌های توموری می‌شود (۲۳-۲۴، ۸). Fonseka و همکاران نمونه‌ای از هم‌کشتی سلول‌های K562 با

سرکوب سیستم ایمنی است. سلول‌های بنیادی دارای پتانسیل درمانی هستند؛ بدین صورت که می‌توانند از پس زدن بافتی جلوگیری کنند و در ترمیم نقایص جنینی و درمان بیماری‌های خود ایمنی نیز کارا باشند (۱۳). دیده شده است که سلول‌های بنیادی می‌توانند تکثیر لئوسیت‌ها را مهار کنند و هر چه میزان دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی بیشتر باشد، این سرکوب نیز بیشتر است (۳۱-۳۲). در تحقیق حاضر نیز با افزایش سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، درصد سلول‌های زنده‌ی توموری کاهش یافت.

Keramidas و همکاران اعلام کردند که خاصیت ضد ایمنی سلول‌های بنیادی به خاطر این است که این سلول‌ها، عوامل محلول را ترشح می‌کنند که این عوامل، پتانسیل تکثیری سلول‌های توموری را کاهش می‌دهند (۳۳). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Zhu و همکاران صورت گرفت، گزارش شد که سلول‌های بنیادی با ترشح موادی از قبیل IL8, IFN $\beta$  (Interferon $\beta$ )، TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor) و IFN $\gamma$ ، IL6 و IFN $\gamma$  مانع تکثیر سلول‌های توموری و همچنین با ترشح عواملی از قبیل Dikfopt باعث القای آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌شوند (۸).

Kucerova و همکاران، اثر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی را بر روی دو رده‌ی سلول توموری مختلف از نوع ملانوما (Melanoma) و گلیوبلاستوما (Glioblastoma) بررسی کردند. اگر چه سلول‌های مزانشیمی به طور کامل مشابه و از یک منشأ بودند، اما وقتی هر دو رده‌ی سلول توموری با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شدند، نتایج مختلفی به دست آمد. سلول‌های ملانوما عوامل پیش رگ‌زایی و پیش التهابی (Pro-inflammatory/pro-angiogenic)



سلول‌های توموری این گروه نسبت به گروه شاهد افزایش بسیار زیادی پیدا کرده است. شاید بتوان از این یافته به این نتیجه رسید که در هم‌کشتی سلول‌های بنیادی و توموری، نسبت سلولی نیز علاوه بر زمان از اهمیت برخوردار است.

نتیجه‌ی تحقیق حاضر با آن چه که Fonseka و همکاران گزارش نمودند، متفاوت است؛ شاید دلیل این تفاوت، استفاده از سلول‌های بنیادی متفاوت باشد، اما نتایج تحقیق حاضر مؤید تحقیق Crop و همکاران مبنی بر آن است که عملکرد سلول‌های بنیادی حتی اگر همگی منشأ مزانشیمی یکسانی داشته باشند، در شرایط متفاوت می‌تواند متفاوت باشد (۳۲).

### نتیجه‌گیری

درمان سرطان (که یکی از معضلات پزشکی جوامع امروز است) توجه بسیاری از دانشمندان و پژوهشگران را به خود جلب کرده است. در تحقیق حاضر اگر چه در نسبت بالای سلول‌های بنیادی به توموری و در مدت ۹۶ ساعت هم‌کشتی، توانست تکثیر سلول‌های توموری را کنترل نماید؛ اما توجه به این نکته مهم است که این نتیجه در محیط آزمایشگاهی (In vitro) و بر روی یک رده‌ی سلولی حاصل شده است و با محیط داخل بدن (In vivo) بسیار متفاوت است. از این رو تحقیقات بسیار زیاد دیگری لازم است تا شاید بتواند در درمان سرطان مؤثر باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مناگرگی به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۲۴۴۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

سلول‌های مزانشیمی مشتق از بند ناف را از طریق هم‌کشتی مستقیم و ترنس ول با نسبت‌های مختلفی از قبیل ۱/۱۰، ۱/۵، ۱/۱ و ۱/۱۰ (سلول بنیادی به توموری) مورد آزمایش قرار دادند. آن‌ها تعداد سلول‌های توموری K562 را در تمام نسبت‌ها ثابت و زمان را ۴۸ ساعت در نظر گرفتند. نتیجه‌ی گزارش این بود که در تمام نمونه‌ها، سلول‌های بنیادی مانع از تکثیر سلول‌های توموری و توقف تقسیم سلولی در مرحله‌ی G0/G1 شده بود و همچنین کاهش رشد سلول‌های توموری در هم‌کشتی مستقیم بیشتر از هم‌کشتی غیر مستقیم بود (۲۴). در تحقیق حاضر، با همین بازه‌ی زمانی (۴۸ ساعت) و با استفاده از هم‌کشتی مستقیم مشاهده شد که سلول‌های بنیادی با این که از لحاظ نسبت، ۱۰ برابر سلول‌های توموری بودند، اما تأثیری بر کاهش رشد تومور نداشتند. در سایر نمونه‌ها، زمانی که سلول‌های توموری از نظر تعداد نسبت به سلول‌های بنیادی بیشتر یا برابر بودند، سلول‌های بنیادی علاوه بر این که تکثیر سلول‌های توموری را مهار نکردند، باعث افزایش رشد سلول‌های توموری نیز شدند. در زمان ۹۶ ساعت در گروهی که هم‌کشتی سلول‌های SHED و K562 به نسبت ۱۰ به ۱ انجام گرفت، یعنی تعداد سلول‌های بنیادی ۱۰ برابر سلول‌های سرطانی بود، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی کاهش معنی‌داری داشت؛ در حالی که در زمان ۴۸ ساعت این هم‌کشتی و این نسبت تأثیری بر روند تکثیر و بقای سلولی نداشت که بیانگر آن است که زمان هم‌کشتی در تکثیر و یا آپوپتوز سلول‌های توموری اهمیت دارد. در هر دو زمان، در گروه دوم و سوم که نسبت سلول‌های K562 به SHED به ترتیب ۱۰ به ۱ و ۱ به ۱ بوده است،

## References

- Cai J, Rao MS. Stem cell and precursor cell therapy. *Neuromolecular Med* 2002; 2(3): 233-49.
- Payne N, Siatskas C, Bernard CC. The promise of stem cell and regenerative therapies for multiple sclerosis. *J Autoimmun* 2008; 31(3): 288-94.
- Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, Zarkesh-Esfahani SH, Heydari F, Mousavi SB, et al. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *Int J Prev Med* 2010; 1(3): 164-71.
- Muller I, Lymperi S, Dazzi F. Mesenchymal stem cell therapy for degenerative inflammatory disorders. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13(6): 639-44.
- Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int* 2008; 32(4): 384-93.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806.
- Petrovic V, Stefanovic V. Dental tissue--new source for stem cells. *Scientific World Journal* 2009; 9: 1167-77.
- Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009; 23(5): 925-33.
- Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(2): 249-61.
- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102(10): 3837-44.
- Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 2008; 217(2): 296-300.
- DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 865601.
- Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 2010; 20(5): 510-8.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 1: e79.
- Rhodes LV, Muir SE, Elliott S, Guillot LM, Antoon JW, Penfornis P, et al. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121(2): 293-300.
- Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y, Wei L. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci* 2012; 2(1): 8.
- Frank RT, Najbauer J, Aboody KS. Concise review: stem cells as an emerging platform for antibody therapy of cancer. *Stem Cells* 2010; 28(11): 2084-7.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007; 28(5): 219-26.
- Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, Wei LL, Chen YN, Cong C, et al. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2): 245-51.
- Siddiqi A, Long LM, Li L, Marciniak RA, Kazhdan I. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *BMC Cancer* 2008; 8: 129.
- Galie M, Konstantinidou G, Peroni D, Scambi I, Marchini C, Lisi V, et al. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene* 2008; 27(18): 2542-51.
- Cousin B, Ravet E, Poglio S, De TF, Bertuzzi M, Lulka H, et al. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One* 2009; 4(7): e6278.
- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, III. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 2011; 29(1): 11-9.
- Fonseka M, Ramasamy R, Tan BC, Seow HF. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSC) inhibit the proliferation of K562 (human erythromyeloblastoid leukaemic cell line). *Cell Biol Int* 2012; 36(9): 793-801.
- Wei Z, Chen N, Guo H, Wang X, Xu F, Ren Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 141.

26. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008; 132(4): 681-96.
27. Yang J, Rostami A, Zhang GX. Cellular remyelinating therapy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; 276(1-2): 1-5
28. Togel F, Westenfelder C. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn* 2007; 236(12): 3321-31.
29. Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Nasresfahani M. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF- $\beta$ 3 in pellet culture system. *Iran J Basic Med Sci* 2008, 11(1): 10-7.
30. Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Sadeghi F, et al. The effect of BMP-6 growth factor on differentiation of adipose-derived stem cells into chondrocyte in pellet culture. *JIMS* 2009, 27(100): 613-44. [In Persian].
31. Zhang X, Jiao C, Zhao S. Role of mesenchymal stem cells in immunological rejection of organ transplantation. *Stem Cell Rev* 2009; 5(4): 402-9.
32. Crop M, Baan C, Weimar W, Hoogduijn M. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation. *Transpl Int* 2009; 22(4): 365-76.
33. Keramidas M, de Fraipont F, Karageorgis A, Moisan A, Persoons V, Richard MJ, et al. The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis. *Stem Cell Res Ther* 2013 29; 4(2): 41.
34. Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova V, Altaner A: Tumor cellsbehaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol Cancer* 2010; 9: 129-34.
35. Suchanek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancakova R, Mokry J, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2010; 53(2): 93-9.
36. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod* 2009; 35(11): 1536-42.
37. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006; 184(3-4): 105-16.

## The Effects of Coculture of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) on K562 Tumor Cells

Mona Gorji<sup>1</sup>, Batoul Hashemibeni PhD<sup>2</sup>, Hamid Bahramian PhD<sup>2</sup>, Hosein Salehi PhD<sup>3</sup>, Razieh Alipour MSc<sup>4</sup>, Maryam Aliakbari<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Due to increased prevalence of cancer in human population, the effectiveness of chemotherapy and drug (therapy) is reducing because of recurrence and drug-resistance. Therefore, scientists are trying other options such as cell-therapy. Among the cells, scientists have more focused on evaluating effect of stem cells on tumor cells. Since there were controversial reports on this effect in literature, the aim of this study was to assess the proliferation and survival of K562 tumor cells cocultured with stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED).

**Methods:** Stem cells were isolated from human exfoliated deciduous teeth and cultured K562 cells were obtained from the Pasteur institute of Iran. Stem cells and K562 were directly cocultured with each other and the ratios of K562 to stem cells were 1/10, 10/1, and 1/1. In this study, the viability and proliferation of the cells via MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and trypan blue staining.

**Findings:** The trypan blue and MTT assay results of 48 hours coculture with ratio of 1/10 in comparison with control group did not show any significance difference. But with this ratio, at 96 hour, proliferation of K562 compared to control had reduced significantly; and in other ratios (1/1 and 1/10) at 48 and 96 hours, proliferation of K562 increased significantly ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Results of our study revealed that in this coculture, increased number of stem cells had an inhibitory effect on proliferation of K562 cells. Moreover, low numbers of stem cells not only were not able to inhibit tumor cells, but also contributed to improve their proliferation.

**Keywords:** Human exfoliated deciduous teeth (SHED), Stem cell, K562 tumor cell, Coculture

**Citation:** Gorji M, Hashemibeni B, Bahramian H, Salehi H, Alipour R, Aliakbari M. **The Effects of Coculture of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) on K562 Tumor Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(304): 1633-45

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

4- PhD student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

5- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

**Corresponding Author:** Batoul Hashemibeni PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

## اثر ضد قارچی اسانس گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba*) بر گونه‌های کاندیدایی جدا شده از واژینیت کاندیدایی در مقایسه با فلوکونازول

نوید امینیان<sup>۱</sup>، دکتر پروین دهقان<sup>۲</sup>، دکتر مصطفی چادگانی‌پور<sup>۳</sup>، دکتر ابراهیم سجادی<sup>۴</sup>، مریم یزدی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** کاندیدا یکی از عوامل شایع عفونت‌های فرصت طلب انسانی است. با توجه به افزایش عفونت‌های فرصت طلب و مصرف بیش از حد داروها، مقاومت نسبی در گونه‌ها نسبت به داروهای ضد قارچی از جمله فلوکونازول ایجاد شده است. با نظر به این موضوع که گیاهان یک منبع الهام بخش برای ساخت داروها می‌باشند، بررسی گیاه خوشاریزه با توجه به بومی بودن در ایران، می‌تواند در شناخت مسیرهای جدید درمان عفونت‌های مقاوم به دارو کمک کننده باشد.

**روش‌ها:** ایزوله‌های قارچی جدا شده از افراد مبتلا به واژینیت کاندیدایی پس از تعیین هویت، به روش RapID™ Yeast plus system مورد استفاده قرار گرفتند. برای آزمون حساسیت دارویی گونه‌ها، از رقت‌های مختلف داروی فلوکونازول و اسانس گیاه خوشاریزه به روش انتشار در ژل استفاده شد و MIC<sub>50</sub> (Minimum inhibitory concentration)، MIC<sub>90</sub> و MFC (Minimal fungicidal concentration) به روش میکرودايلوشن برای هر یک از گونه‌ها به صورت جداگانه ثبت و مقایسه گردید.

**یافته‌ها:** از تعداد ۱۵ گونه‌ی کار شده، ۶۶ درصد گونه‌ها نسبت به فلوکونازول حساس بودند و فقط دو گونه‌ی ۵۳ (گلابراتا) و ۲۹ (آلبیکنس) وابسته به دوز و سه گونه‌ی ۶۰ (گلابراتا)، ۶۸ (کروزه‌ای) و ۱۴۹ (روگوزا) نسبت به فلوکونازول مقاوم بودند؛ در حالی که نسبت به اسانس خوشاریزه در محدوده‌ی وابسته به دوز قرار گرفتند. در بررسی اسانس خوشاریزه، ۶ درصد گونه‌ها حساس، ۴۸ درصد وابسته به دوز و ۴۶ درصد مقاوم گزارش گردید. کمترین مقدار MIC<sub>50</sub>، MIC<sub>90</sub> و MFC فلوکونازول و اسانس خوشاریزه برای گونه‌ی ۳۱ (آلبیکنس) و بیشترین آن‌ها برای گونه‌ی ۶۸ (کروزه‌ای) ثبت گردید.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد، می‌توان در کنار مصرف فلوکونازول، از اسانس خوشاریزه به صورت خوراکی و یا تهیه‌ی لوسيون در درمان مکمل واژینیت کاندیدایی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** واژینیت کاندیدایی، فلوکونازول، گیاه خوشاریزه، اسانس، میکرودايلوشن

**ارجاع:** امینیان نوید، دهقان پروین، چادگانی‌پور مصطفی، سجادی ابراهیم، یزدی مریم. اثر ضد قارچی اسانس گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba*) بر گونه‌های کاندیدایی جدا شده از واژینیت کاندیدایی در مقایسه با فلوکونازول. مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۴): ۱۶۴۶-۱۶۵۸

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## مقدمه

کاندیدیازیس بدون شک یکی از شایع‌ترین عفونت‌های فرصت طلب انسانی است که توانایی ایجاد عفونت‌های حاد و مزمن جلدی، جلدی-مخاطی و سیستمیک را دارد (۱). احتمال می‌رود که ۷۵ درصد از خانم‌ها حداقل یک بار در طول عمر خود دچار عفونت کاندیدایی واژن شوند و ۴۵ درصد از آن‌ها دو یا سه بار دیگر مورد حمله‌ی کاندیدایی قرار گیرند که حدود ۵ درصد آنان به عفونت مزمن مبتلا می‌شوند (۲-۳). با توجه به مصرف روزافزون داروها و همچنین افزایش عفونت‌های با منشأ کاندیدایی، گزارش‌هایی مربوط به افزایش مقاومت گونه‌های کاندیدا بر داروهای ضد قارچی از جمله فلوکونازول مشاهده شده است (۴).

غالب عفونت‌های مقاوم امروزی توسط گونه‌ی آلبیکنس و در برخی موارد جایگزینی عوامل کاندیدایی با گونه‌های مقاومی از جمله گلابراتا، کروزه‌ای و تروپیکالپس همراه است (۵). با توجه به این مطالب، یافتن درمان جایگزین داروهای شیمیایی برای حذف مقاومت، عوارض جانبی و جلوگیری از عود مکرر، ضروری به نظر می‌رسد (۶).

به دنبال پیشرفت علم و اهمیت بخش سلامت در جوامع، استفاده از داروها افزایش یافته است و با توجه به عوارض جانبی، قیمت بالا و مراحل پیچیده‌ی تولید داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷). قدمت استفاده از گیاهان دارویی به سال‌ها پیش و متناسب با قدمت تمدن بر می‌گردد (۶). گیاه درمانی شاخه‌ای از طب سنتی است که در کشورهای با سابقه‌ای مثل ایران که غنی از گنجینه‌ی گیاهان مختلف بومی است تا یک

قرن پیش و قبل از پیدایش داروهای سنتتیک نقش اصلی را در درمان بیماری‌ها داشته است (۸). تحقیقات زیادی روی گیاهان انجام شده تا اثرات درمانی آن‌ها به اثبات برسد، اما بسیاری از گیاهان نیز وجود دارد که بدون هیچ سابقه‌ی علمی از آن‌ها به صورت سنتی استفاده می‌گردد (۹).

از مطالعات انجام شده در ایران، می‌توان به بررسی اثر گیاه خوشاریزه روی درماتوفیت‌ها توسط آویژگان و همکاران (۱۰) و بررسی اثر ضد قارچی کاتچین موجود در چای سبز توسط حقیقی و همکاران (۱۱) اشاره کرد. همچنین بررسی اثر عصاره‌ی سیر و موسیر بر ضد گونه‌های کاندیدا توسط مدنی و همکاران (۱۲) و مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی الکلی خوشاریزه در برابر فلوکونازول توسط آویژگان و همکاران (۱۳) از دیگر مطالعات می‌باشد. محققان زیادی اقدام به بررسی اثرات ضد قارچی گیاهان بومی مناطق زندگی خود نمودند که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌ی Hammer و همکاران (۱۴) بر روی بیش از ۵۰ گونه‌ی بومی مناطق استرالیا و یا مطالعه‌ی Duarte و همکاران (۱۵) در مناطق برزیل اشاره کرد. در حال حاضر، حدود نیمی از فراورده‌های دارویی آمریکای منشأ گیاهی دارند (۱۶)؛ اما کمبود اطلاعات دارویی و درمانی گروه بزرگی از فراورده‌های طبی گیاهی، زمینه‌ساز مشکل بزرگی در استفاده‌ی بهینه از گیاهان شده است (۱۷). در ضمن، روند توسعه‌ی داروهای ضد قارچی در مقابل داروهای ضد باکتریایی، بسیار کند است و نیاز به افزایش تنوع داروهای قارچی با کاهش عوارض جانبی، بیش از پیش احساس می‌شود (۱۸).

گونه‌ای از گیاه Echinophora در مناطق مرکزی و



مورد مطالعه قرار گرفت. برای جلوگیری از تداخل اطلاعات پیشین روی نتایج آزمایش، گونه‌ها کدبندی شدند. کد گونه‌های مورد استفاده به شرح زیر بود: آلبیکنس (۳۱، ۲۹، ۳۲، ۱۱۱، ۱۰۰)، کفایر (۱۴۵، ۴)، گلابراتا (۵۳، ۶۰)، روگوزا (۱۴۹)، کروزه‌ای (۹۰، ۶۸)، پاراپسیلوزیس (۱۱۸)، زیلانوتیدس (۲۲)، گونه‌ی استاندارد آلبیکنس (PTCC۵۰۲۷).

محیط کشت SDA: محیط سابرو دکستروز آگار تجاری (شرکت Merck، آلمان) خریداری و بر طبق دستورالعمل تهیه گردید.

YPD (Yeast extract- peptone- dextrose):

محیط بیست پپتون دکستروز به شرح زیر تهیه و آماده‌ی مصرف گردید:

۲۰ g دکستروز + ۲۰ پپتون + ۱۰ g Yeast extract  
این مقادیر با استفاده از آب مقطر به حجم ۱ L رسانده شد. محیط YPD پس از استریلیزاسیون در حجم‌های ۴۰ ml درون ارلن مایر استریل ریخته شد و از کلنی تازه به حجم یک لوپ در محیط حل گردید. این روش امکان این را می‌دهد که بلاستوکونیدی‌های همگن و مشخص حاصل شوند. ارلن‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ °C و ۱۵۰ rpm در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند و سپس با استفاده از لام نئوبار، رقت  $10^6$  CFU/ml از ته‌نشین از کلنی‌ها در آب مقطر تهیه شد.

تهیه‌ی فلوکونازول آماده‌ی مصرف: برای این منظور، با حل کردن پودر خالص فلوکونازول (شرکت Merck، آلمان) در محلول دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  به عنوان محلول استوک تهیه گردید.

غرب ایران به صورت خشک شده در پنیر و ماست به عنوان طعم دهنده (۱۹) و به عنوان ممانعت کننده از رشد کپک‌ها در خیار شور و رب گوجه فرنگی به کار می‌رود (۲۰). نام محلی آن خوشاریزه می‌باشد (۲۱). از اندامک‌های هوایی گیاه (ساقه، برگ و گل) می‌توان به روش تقطیر اسانس تهیه کرد که این اسانس، شامل ترکیبات مؤثره‌ی گیاه است (۲۲). این گیاه حاوی ترکیبات مونوترپنی هیدروکربن‌دار می‌باشد که از آن جمله می‌توان به ترکیبات ساپونین، آلکالوئید و فلاونوئید اشاره کرد که در واقع، ماده‌ی مؤثره‌ی گیاه به شمار می‌روند (۲۰).

در این مطالعه، مقایسه‌ی اثر اسانس تهیه شده از گیاه خوشاریزه در ممانعت از رشد گونه‌های بالینی جدا شده از واژینیت کاندیدیایی در برابر فلوکونازول مورد بررسی قرار گرفت تا با بررسی فراتر از یک نمونه‌ی استاندارد آزمایشگاهی، نتایج واقع گرایانه‌تری از این گیاه حال شود.

## روش‌ها

گونه‌های مورد استفاده: در این مطالعه از گونه‌های جدا شده از واژینیت کاندیدیایی استفاده شد. گونه‌های جدا شده پس از کشت در SDA (Sabouraud dextrose agar) توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند جذب قندها به روش Rapid™ yeast plus system، ایجاد جرم تیوب و تولید کلامیدوکونیدی شناسایی شدند و در مجموع، تعداد ۱۵ سویه (تعداد ۶ سویه از *Candida albicans*، از *C. kefyre*، *C. glabrata* و *C. krusei* هر یک ۲ سویه و از انواع *C. rugosa*، *C. parapsilosis* و *C. zeylanoides* به تعداد ۱ سویه)

پلیت انجام شد و هاله‌ی عدم رشد پس از ۲۴-۴۸ ساعت در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  ثبت و مقایسه گردید. این مراحل برای هر یک از گونه‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت.

تعیین MIC و MFC: برای این منظور، رقت‌های سریال از  $100\ \mu\text{g}$  تا  $0.195$  از محلول استوک اولیه تهیه گردید. در ابتدای امر، رقت‌های سریال تهیه شده در چاهک‌های حفر شده در SDA ریخته شد و پس از ۲۴-۴۸ ساعت، هاله‌ی عدم رشد در چاهک‌ها بررسی گردید. این کار به منظور جلوگیری از اتلاف وقت و به دلیل مقدار کم اسانس گیاه انجام شد و به کمک این روش، حد پایین-آخرین رقت ثبت هاله‌ی عدم رشد- و حد بالا-اولین رقت رشد کامل کاندیدا-، مشخص شد. در مرحله‌ی بعد، به رقت‌سازی دقیق‌تر بین دو حد بالا و پایین مختص هر گونه انجام شد. در ادامه‌ی کار و برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC یا Minimum inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimal fungicidal concentration) یا MFC از رقت‌سازی در میکروپلیت الیزا استفاده شد. درون هر چاهک  $200\ \mu\text{l}$  از محیط Sabouraud Dextrose Broth) و  $10\ \mu\text{l}$  از رقت  $10^6$  کلنی از هر گونه ریخته شد و رقت‌های مختلف از اسانس و دارو به صورت سریال تهیه گردید. در چاهک شاهد منفی  $200\ \mu\text{l}$  DMSO و در چاهک شاهد مثبت  $10\ \mu\text{l}$  از کلنی بدون اسانس و دارو استفاده شد و پس از ۲۴-۴۸ ساعت انکوباسیون در  $30^{\circ}\text{C}$  برای مشاهده‌ی اثربخشی دارو و اسانس،  $10\ \mu\text{l}$  از محتوای هر چاهک در محیط SDA به شکل سفره‌ای کشت داده شد و پس از ۲۴-۴۸ ساعت

محلول حاصل، با فیلتر  $0.22\ \mu\text{m}$  استریل شد و رقت‌های مورد نظر به دست آمد.

تهیه‌ی اسانس گیاه خوشاریزه: پس از جمع‌آوری گیاه خوشاریزه در اوایل شهریور تا اواخر مهر و خشک کردن آن با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر، اسانس تهیه شد. به ازای هر  $50\ \text{kg}$  از گیاه، مقدار  $1\ \text{ml}$  حاوی  $100\ \text{mg}$  از ماده‌ی مؤثره‌ی گیاه به دست آمد. پس از استریل کردن محلول با استفاده از فیلتر  $0.22\ \mu\text{m}$ ، رقت‌های مورد نظر تهیه و آماده‌ی مصرف گردید.

تعیین حساسیت گونه‌ها: با استفاده از روش انتشار در ژل درون چاهک‌ها بر طبق روش NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) عمل شد (۲۳). بر روی یک پلیت حاوی محیط SDA، سه چاهک به قطر  $6\ \text{mm}$  و حجم  $50\ \mu\text{l}$  حفر شد. در چاهک اول،  $40\ \mu\text{l}$  از محلول فلوکونازول و در چاهک دوم  $40\ \mu\text{l}$  از اسانس خوشاریزه و در چاهک سوم برای حذف اثر حلال به عنوان شاهد منفی، از  $40\ \mu\text{l}$  DMSO استفاده گردید. غلظت مورد استفاده از دارو برای تعیین حساسیت گونه‌ها بر طبق روش NCCLS،  $25\ \mu\text{g/ml}$  بود. با توجه به مقایسه‌ی اثر ماده‌ی مؤثره‌ی گیاه خوشاریزه با فلوکونازول و استفاده از روش مرجع مشترک برای هر دو، تمامی موارد اعم از رقت‌های مورد استفاده، محیط‌های کشت و روش‌های سنجش برای صحت بخشی بیشتر به نتایج، به صورت یکسان و بر طبق روش NCCLS انتخاب شد.

به مدت یک ساعت به محلول‌های درون چاهک اجازه‌ی انتشار داده شد و سپس کشت سفره‌ای  $10^6\ \text{CFU/ml}$  از کلنی‌ها به صورت جداگانه در هر



گروه مورد مطالعه و به تفکیک هر گونه، وجود اختلاف آماری در میانگین طول هاله‌ی عدم رشد با آزمون  $t$  مستقل دو نمونه‌ای بررسی گردید. همان گونه که در جدول ۱ آمده است، به جز دو گونه‌ی شماره‌ی ۲۹ (آلیکسنس) و ۵۳ (گلابراتا)، عملکرد فلوکونازول و اسانس خوشاریزه در دوز استاندارد  $25 \mu\text{g}$  از نظر آماری اختلاف نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).

سه گونه‌ی ۶۰ (گلابراتا)، ۶۸ (کروزه‌ای) و ۱۴۹ (رگوزا) در برابر فلوکونازول رشد کامل داشتند و به عنوان گونه‌های مقاوم معرفی شدند. نکته‌ی جالب توجه در این سه گونه، قرار گرفتن در محدوده‌ی وابسته به دوز اسانس خوشاریزه می‌باشد. نتایج مربوط به حساسیت گونه‌ها در جدول ۱ و نمودار مربوط به مقایسه‌ی آن‌ها در شکل ۱ آمده است.

انکوباسیون در  $30^\circ\text{C}$ ، پلیت‌ها با پلیت شاهد مقایسه و ثبت گردید. تمامی مراحل در ۳ تکرار انجام پذیرفت. اولین رقتی که باعث ممانعت از رشد ۵۰ درصد گونه‌ها می‌شود، به عنوان  $\text{MIC}_{50}$ ؛ اولین رقتی که از رشد ۹۰ درصد گونه‌ها ممانعت می‌کند، به عنوان  $\text{MIC}_{90}$  و اولین رقتی که ۹۹/۹ درصد گونه‌ها را از بین می‌برد، به عنوان MFC گزارش می‌گردد.

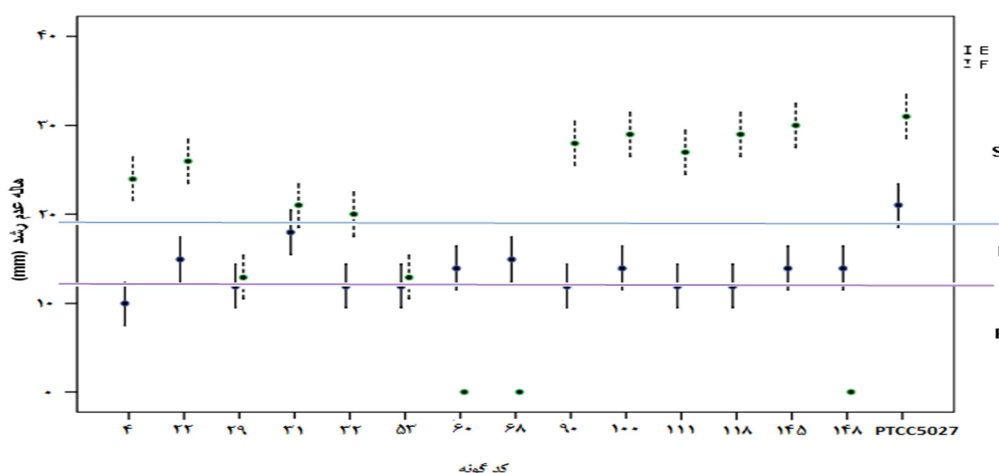
### یافته‌ها

بر اساس جدول NCCLS، به ازای  $25 \mu\text{g}$  از فلوکونازول و اسانس هاله‌ی عدم رشد کمتر از ۱۲ به عنوان مقاوم، هاله‌ی عدم رشد بین ۱۳-۱۸ به عنوان وابسته به دوز و هاله‌ی عدم رشد بیشتر از ۱۹ به عنوان حساس گزارش می‌گردد. پس از بررسی طبیعی بودن توزیع اندازه‌های قطر هاله‌ی عدم رشد در دو

جدول ۱. هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر

گونه‌ها	فلوکونازول $25 \mu\text{g}$	حساسیت	اسانس خوشاریزه $25 \mu\text{g}$	حساسیت	مقدار P
۴	۲۴	S	۱۰	R	$< 0.001$
۲۲	۲۶	S	۱۵	I	$< 0.001$
۲۹	۱۳	I	۱۲	R	۰/۲۸۸
۳۱	۲۱	S	۱۸	I	۰/۰۲۱
۳۲	۲۰	S	۱۲	R	۰/۰۰۱
۵۳	۱۳	I	۱۲	R	۰/۲۸۸
۶۰	N	R	۱۴	I	$< 0.001$
۶۸	N	R	۱۵	I	$< 0.001$
۹۰	۲۸	S	۱۲	R	$< 0.001$
۱۰۰	۲۹	S	۱۴	I	$< 0.001$
۱۱۱	۲۷	S	۱۲	R	$< 0.001$
۱۱۸	۲۹	S	۱۲	R	$< 0.001$
۱۴۵	۳۰	S	۱۴	I	$< 0.001$
۱۴۹	N	R	۱۴	I	$< 0.001$
PTCC ۵۰۲۷	۳۱	S	۲۱	S	$< 0.001$
	$R = 0.20, S = 0.66, I = 0.14$		$R = 0.47, S = 0.6, I = 0.93$		

R: مقاوم، I: وابسته به دوز، S: حساس، N: عدم تأثیر دارو و اسانس



شکل ۱. نمودار مربوط به مقایسه‌ی حساسیت گونه‌ها به تفکیک  
R: مقاوم، I: وابسته به دوز، S: حساس

$2/00$ ،  $2/75$  و  $3/25$  و بیشترین آن‌ها برای گونه‌ی ۶۸ (کروزه‌ای) به ترتیب برابر  $49/00$ ،  $48/00$  و  $40/00$  ثبت گردید. این مقادیر در اسانس خوشاریزه برای گونه‌ی ۳۱ (آلیکنس) به ترتیب برابر  $3/75$ ،  $5/75$  و  $6/25$  و برای گونه‌ی ۶۸ (کروزه‌ای) به ترتیب برابر  $15/50$ ،  $25/00$  و  $26/50$  ثبت و گزارش گردید. نتایج مربوط به MIC و MFC در جدول ۳ و نمودار مربوط به مقایسه‌ی آن‌ها در شکل ۲ آمده است.

### بحث

کاندیدای یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های فرصت طلب انسانی است (۲۴). عفونت‌های قارچی فرصت طلب در اکثر موارد به دلیل نقص سیستم ایمنی در افراد ایجاد می‌گردد. انواع بدخیمی‌های خونی، مصرف بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها و کورتیکواستروئیدها از جمله عوامل زمینه‌ساز ابتلا به عفونت‌های فرصت طلب مانند کاندیدیازیس می‌باشد (۲۵). گونه‌های کاندیدا یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی واژینیت می‌باشند (۲۵). عامل اکثر موارد واژینیت

رقت‌های بین  $100-195/0$  از اسانس و دارو تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. تا رقت  $1/562$  از اسانس و دارو بر ارگانسیم‌ها به طور کامل بی‌تأثیر بودند. حساس‌ترین گونه‌ها به رقت‌های کم فلوکونازول، گونه‌های ۲۲ (زیلانوییدس) و ۳۱ (آلیکنس) بودند که هاله‌ی عدم رشد برای رقت  $3/125$  از خود نشان دادند. سه گونه‌ی ۶۰ (گلابراتا)، ۶۸ (کروزه‌ای) و ۱۴۹ (روگوزا) که نسبت به فلوکونازول مقاومت کامل داشتند، در رقت  $12/5$  از اسانس، هاله‌ی عدم رشد نشان دادند. نکته‌ی قابل توجه در مورد گونه‌ی ۵۳ (گلابراتا) و ۲۹ (آلیکنس) ثبت هاله‌ی عدم رشد برای رقت بالاتر اسانس خوشاریزه نسبت به فلوکونازول می‌باشد. ۴۸ درصد گونه‌ها در برابر اسانس خوشاریزه مقاوم بودند و سایر گونه‌ها در محدوده‌ی وابسته به دوز قرار داشتند. نتایج مربوط به رقت‌های سریال در جدول ۲ آمده است.

کمترین  $MIC_{50}$ ،  $MIC_{90}$  و MFC برای فلوکونازول و اسانس خوشاریزه، مربوط به گونه‌ی ۳۱ (آلیکنس) بود که برای فلوکونازول به ترتیب

کاندیدایی، گونه‌ی آلبیکنس می‌باشد، اما در مطالعات انجام شده عامل حدود ۴۷-۱۵ درصد موارد بیماری، گونه‌های غیر آلبیکنس مثل گلابراتا، کروزه‌ای و تروپیکالیس گزارش شده است (۲۶).

جدول ۲. رقت‌ها و هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر

حد پایین	حد بالا	رقت‌ها (µg)					ماده‌ی مؤثره	کد گونه
		۱/۵۶۲	۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	۲۵/۰۰۰		
هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر								
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۸	۱۴	۲۴	F	۴
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۷	۱۰	E	
۱/۵۶۲	۳/۱۲۵	N	۵	۹	۱۵	۲۶	F	۲۲
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۶	۸	۱۵	E	
۱۲/۵۰۰	۲۵/۰۰۰	N	N	N	N	۱۳	F	۲۹
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۷	۱۲	E	
۱/۵۶۲	۳/۱۲۵	N	۵	۹	۱۲	۲۱	F	۳۱
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۸	۱۱	۱۸	E	
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۸	۱۱	۲۰	F	۳۲
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۷	۱۲	E	
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۸	۱۳	F	۵۳
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۵	۷	۱۲	E	
-----	-----	N	N	N	N	N	F	۶۰
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۶	۷	۱۴	E	
-----	-----	N	N	N	N	N	F	۶۸
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۷	۱۵	E	
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۸	۱۶	۲۸	F	۹۰
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۸	۱۲	E	
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۹	۱۶	۲۹	F	۱۰۰
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۶	۸	۱۴	E	
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۱۵	۲۷	F	۱۱۱
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۸	۱۲	E	
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۸	۱۶	۲۹	F	۱۱۸
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۶	۱۲	E	
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۸	۱۶	۳۰	F	۱۴۵
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۷	۱۴	E	
-----	-----	N	N	N	N	N	F	۱۴۹
۶/۲۵۰	۱۲/۵۰۰	N	N	N	۸	۱۴	E	
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۱۰	۱۶	۳۱	F	۵۰۲۷
۳/۱۲۵	۶/۲۵۰	N	N	۹	۱۵	۲۱	E	

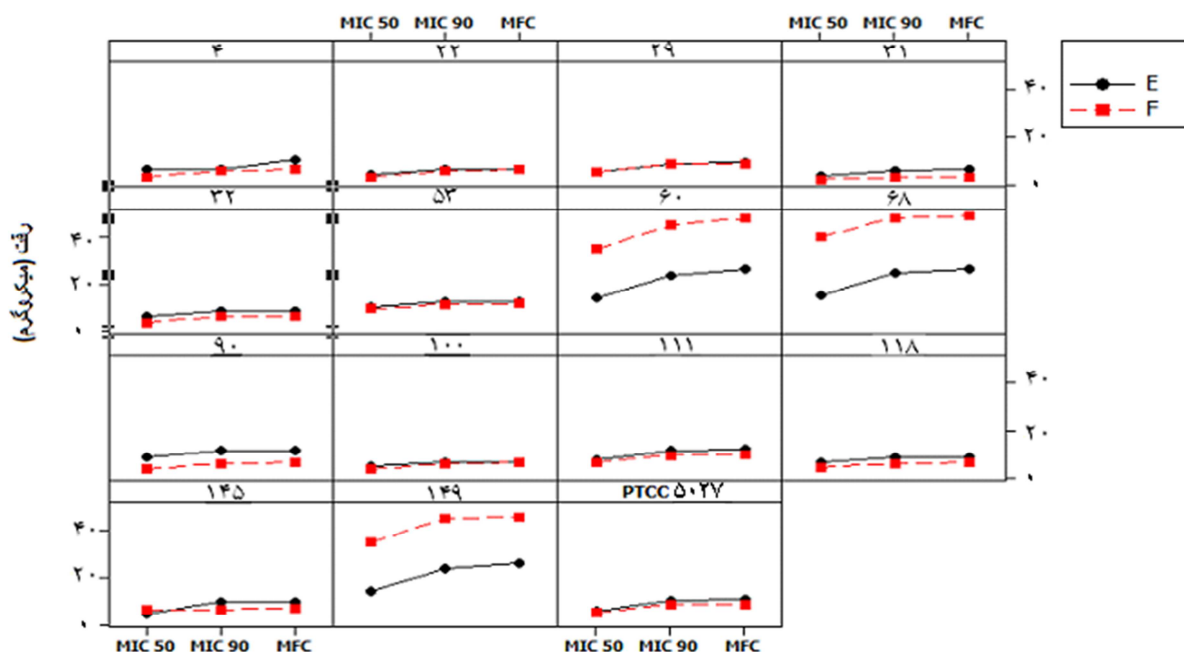
F: فلوکونازول، E: اسانس خوشاریزه، N: عدم تأثیر دارو و اسانس

جدول ۳. نتایج مربوط به MIC و MFC به تفکیک گونه‌های مورد مطالعه

MFC		MIC ۹۰		MIC ۵۰		کد گونه‌ها
E	F	E	F	E	F	
۱۰/۵۰	۶/۲۵	۶/۲۵	۵/۷۵	۶/۵۰	۳/۲۵	۴
۶/۵۰	۶/۲۵	۶/۲۵	۵/۷۵	۴/۲۵	۳/۰۰	۲۲
۹/۰۰	۸/۷۵	۸/۷۵	۸/۵۰	۵/۵۰	۵/۲۵	۲۹
۳/۲۵	۳/۲۵	۵/۷۵	۲/۷۵	۳/۷۵	۲/۰۰	۳۱
۸/۷۵	۶/۵۰	۸/۵۰	۶/۲۵	۶/۵۰	۳/۷۵	۳۲
۱۲/۷۵	۱۱/۷۵	۱۲/۵۰	۱۱/۵۰	۱۰/۵۰	۹/۵۰	۵۳
۲۶/۵۰	۴۸/۰۰	۲۴/۰۰	۴۵/۰۰	۱۴/۵۰	۳۵/۰۰	۶۰
۲۶/۵۰	۴۹/۰۰	۲۵/۰۰	۴۸/۰۰	۱۵/۵۰	۴۰/۰۰	۶۸
۱۱/۷۵	۶/۲۵	۱۱/۵۰	۵/۷۵	۸/۵۰	۳/۷۵	۹۰
۶/۵۰	۶/۲۵	۶/۲۵	۵/۷۵	۴/۷۵	۳/۷۵	۱۰۰
۱۲/۰۰	۱۰/۰۰	۱۱/۵	۹/۵۰	۷/۵۰	۶/۵۰	۱۱۱
۸/۷۵	۶/۲۵	۸/۵۰	۵/۷۵	۶/۲۵	۴/۲۵	۱۱۸
۹/۷۵	۷/۰۰	۹/۵۰	۶/۵۰	۴/۷۵	۶/۲۵	۱۴۵
۲۶/۰۰	۴۶/۰۰	۲۴/۰۰	۴۵/۰۰	۱۴/۵۰	۳۵/۰۰	۱۴۹
۱۰/۷۵	۸/۷۵	۱۰/۵۰	۸/۵۰	۵/۷۵	۵/۲۵	PTCC ۵۰۲۷

F: فلوکونازول، E: اسانس خوشاریزه

MIC: Minimum inhibitory concentration; MFC: Minimal fungicidal concentration



MIC: Minimum inhibitory concentration; MFC: Minimal fungicidal concentration

شکل ۲. مقایسه‌ی MIC<sub>۵۰</sub>، MIC<sub>۹۰</sub> و MFC در گونه‌های مختلف کاندیدا

اثبات رسیده است (۲۰). بررسی‌ها نشان داده است که مکانیسم عمل ساپونین‌ها، اثر روی غشای سلولی قارچ‌ها می‌باشد که به نوعی با مکانیسم عمل داروهای گروه آزول مطابقت دارد (۲۸)، اما عوارض جانبی گروه آزول از جمله فلوکونازول که قابلیت واکنش با سیستم آنزیمی سیتوکروم P۴۵۰ را دارند، باعث ایجاد اختلال در کارایی این آنزیم‌ها می‌شود و همچنین مصرف بیش از حد آن‌ها باعث به وجود آمدن گونه‌های مقاوم به درمان با این داروها گشته است (۲۹).

بنا بر مطالعات انجام شده، در صورتی که برخی از انواع ترکیبات موجود در گیاهان که به صورت خالص تهیه می‌شوند، با سایر ترکیبات موجود در گیاه همراه باشند، خاصیت عوارض جانبی آن‌ها از بین می‌رود و تنها اثرات مفید آن‌ها باقی می‌ماند (۳۰).

مطالعات فراوانی در زمینه‌ی تأثیرات ضد میکروبی گیاهان به انجام رسیده است و تعداد این تحقیقات در کشور ایران که یک منطقه‌ی بومی برای بسیاری از گیاهان به شمار می‌رود، بسیار زیاد است.

آویژگان و همکاران بر روی گیاه خوشاریزه تحقیقاتی انجام دادند که هدف آن‌ها بررسی اثر عصاره‌ی این گیاه بر گونه‌ی استاندارد کاندیدا بود. این مطالعه حاکی از معرفی غلظت ۲ mg/ml از عصاره‌ی گیاه به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد گونه‌ها (MIC) می‌باشد که با نتایج مطالعه‌ی حاضر مغایرت‌هایی داشت (۱۳). از آن جایی که گونه‌های مورد مطالعه‌ی حاضر بالینی بودند و از واژینیت کاندیدیایی جدا شده بودند، نسبت به غلظت‌های مختلف اسانس، واکنش‌های متفاوتی نشان دادند. اسانس مورد مطالعه حاوی تمامی ماده‌ی

قدمت استفاده از داروهای گیاهی به سال‌ها پیش بر می‌گردد و در واقع، بشر از اوایل تمدن از گیاهان به صورت سینه به سینه و بدون هیچ پایه‌ی علمی و تنها از روی سابقه‌ی تجربی در درمان عفونت‌ها و التیام زخم‌ها استفاده می‌کرده است (۶). در حال حاضر، حدود نیمی از داروهای شیمیایی سنتتیک در آمریکا منشأ گیاهی دارند (۱۶). با توجه به این که روند توسعه‌ی داروهای ضد قارچی در برابر داروهای ضد باکتریایی بسیار کند است و با افزایش روزافزون میزبان مناسب برای عفونت قارچی فرصت طلب و مقاومت‌های به وجود آمده در اثر مصرف بی‌رویه‌ی داروها، نیاز به تنوع داروهای قارچی با شناسایی منابع گیاهی به علت عوارض کم، از اهمیت بیشتری برخوردار شده است (۱۸).

گونه‌ی گیاهی *Echinophora* به صورت چاشنی غذایی و معطر کننده در پنیر و ماست (۱۹) و همچنین به عنوان ممانعت کننده از رشد کپک‌ها در خیار شور و رب گوجه فرنگی استفاده می‌گردد (۲۰). این گیاه دارای ۱۰ گونه‌ی شناخته شده است که ۴ گونه‌ی آن بومی ایران است و از این گونه‌ها ۲ گونه‌ی *Cinerea* و *Platyloba* اندمیک مناطق مرکزی و غربی ایران می‌باشند (۲۷). نام محلی آن خوشاریزه است و در اواخر شهریور و اوایل مهر ماه رشد می‌کند (۲۱).

در مطالعه‌ی اصغری و همکاران اسانس گیاه خوشاریزه به روش کروماتوگرافی گازی آنالیز شد و مشخص گردید ترکیبات مؤثره‌ی گیاه شامل ۸۳ درصد مونوترپن هیدروکربنی می‌باشد که قسمت عمده‌ی آن را (ترانس بتا اوسیمین) تشکیل می‌دهد (۲۲). مونوترپن‌ها شامل ترکیبات ساپونین، آلکالوئید و فلاونوئیدها می‌باشد که اثر ضد قارچی آن‌ها به

مؤثره‌ی گیاه می‌باشد که به نظر می‌رسد اثربخشی بیشتری نسبت به عصاره‌ی الکلی گیاه داشته باشد؛ به گونه‌ای که غلظت‌های پایین مؤثر بر گونه‌ها تأیید کننده‌ی این ادعا می‌باشد.

مطالعات مختلفی که در حوزه‌ی مقاومت دارویی انجام شده است، تأیید کننده‌ی مقاومت نسبی گونه‌هایی مثل کروزه‌ای و گلابراتا نسبت به طیف وسیعی از داروهای ضد قارچی می‌باشد که این نتیجه، در مطالعه‌ی حاضر نیز به اثبات رسیده است که مقاومت کامل سه گونه‌ی ۶۰ (گلابراتا)، ۶۸ (کروزه‌ای) و ۱۴۹ (روگوزا) نسبت به فلوکونازول مبین این مطلب است.

این اثربخشی در مطالعه‌ی مدنی و همکاران نیز به گونه‌ی دیگری به اثبات رسیده است. آن‌ها اثبات کردند دو گونه‌ی گلابراتا و تروپیکالین در مقابل عصاره‌ی سیر و موسیر مقاومت نشان داده‌اند؛ این در حالی است که سایر گونه‌های مورد بررسی از جمله گونه‌ی آلبیکنس به غلظت برابر از این عصاره حساس بودند و رشد نکردند (۱۲). این موضوع، بیش از پیش تفاوت گونه‌ها در پاسخ به عوامل ضد قارچی را آشکار می‌کند و مبین این مطلب است که برای بررسی اثربخشی ترکیب جدید، باید از تعداد بیشتری از گونه‌ها با تفاوت‌های رفتاری مختلف استفاده شود تا نتایج از صحت بیشتری برخوردار باشد که این موضوع در مطالعه‌ی حاضر رعایت گردیده و سعی شده است با استفاده از تعداد بیشتر گونه‌ها و منشأ بالینی آن‌ها، نتایج واقع‌گرایانه‌تری حاصل شود.

با توجه به جدول NCCLS که اشاره به حساس بودن گونه‌هایی با هاله‌ی عدم رشد بیش از ۱۹ mm در مقابل ۲۵ µg از فلوکونازول دارد، نتایج به دست

آمده نشان دهنده‌ی حساسیت حدود ۶۶ درصد از گونه‌ها به فلوکونازول است، اما در بین سایر گونه‌ها، سه گونه‌ی ۶۰ (گلابراتا)، ۶۸ (کروزه‌ای) و ۱۴۹ (روگوزا) رشد کامل داشتند و هاله‌ی عدم رشد از خود در برابر فلوکونازول نشان ندادند که با توجه به جدول NCCLS، این گونه‌ها مقاوم به فلوکونازول معرفی می‌گردند؛ چرا که بر اساس این جدول، هاله‌ی عدم رشد کمتر از ۱۲ مقاوم به شمار می‌رود.

نکته‌ی مهم در مورد این سه گونه، ثبت هاله‌ی عدم رشد در محدوده‌ی وابسته به دوز (۱۸-۱۳) برای اسانس خوشاریزه است که به ترتیب هاله‌ی عدم رشدی معادل ۱۴، ۱۵ و ۱۴ را از خود نشان دادند (۲۳).

دو گونه‌ی ۵۳ (گلابراتا) و ۲۹ (آلبیکنس) نسبت به فلوکونازول و اسانس خوشاریزه در محدوده‌ی وابسته به دوز می‌باشند. نکته‌ی قابل توجه در این دو گونه، نتایج حاصل از رقت سریال اسانس و دارو می‌باشد که برای گونه‌ی ۵۳ در رقت ۶/۲۵ µg و برای گونه‌ی ۲۹ رقت ۱۲/۵ µg از اسانس هاله‌ی عدم رشدی برابر ۵ mm ثبت شد. در حالی که این رقت از فلوکونازول بر این گونه‌ها بی‌اثر بوده است. توجه به این یافته شاید مبین این موضوع باشد که می‌توان از اسانس خوشاریزه در مواجهه با این گونه‌ها که رفتار متفاوتی از خود نشان می‌دهند، به صورت درمان مکمل استفاده و اثر سینرژیسم آن بر دارو را بررسی کرد.

بحث مقاومت گونه‌های مختلف به یک گیاه و رفتارهای متفاوت این گونه‌ها در مطالعه‌ی آویژگان و همکاران بر روی درماتوفیت‌ها به چالش کشیده شده است و نتایج حاصل نشان دهنده‌ی مقاومت دو گونه‌ی روبروم و جیستوم به گیاه خوشاریزه بود؛ این در حالی است که سایر گونه‌ها به غلظت برابر از

نتیجه گیری نهایی این که با توجه به مقاومت سه گونه‌ی ۶۰ (گلابراتا)، ۶۸ (کروزه‌ای) و ۱۴۹ (روگوزا) و همچنین وابسته به دوز بودن دو گونه‌ی ۵۳ (گلابراتا) و ۲۹ (آلبیکنس) نسبت به فلوکونازول، در کنار نتایج امیدوار کننده‌ی این گونه‌ها در برابر اسانس خوشاریزه، به نظر می‌رسد می‌توان در کنار مصرف دارو، از اسانس گیاه به صورت خوراکی و یا تهیه‌ی لوسیون و مصرف موضعی در درمان مکمل افراد مبتلا به واژینیت کاندیدیایی استفاده نمود که این امر به بررسی‌های کارشناسی دقیق‌تر نیاز دارد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد نوید امینیان به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۲۲۰۲ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

عصاره‌ی خوشاریزه حساس بودند (۳۱). این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابقت بیشتری دارد. در بررسی تأثیر گیاهان روی قارچ‌ها، می‌توان به ترکیبات حاصل از گیاهان آویشن، میخک، دارچین، جعفری مکزیکی، سیر و غیره اشاره کرد که در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شده است (۳۲-۳۳).

حقیقی و همکاران اثبات کردند که کاتچین موجود در چای سبز، اثر مناسب‌تری نسبت به فلوکونازول در از بین بردن بیوفیلم کاندیدیایی دارد (۱۱). هر چند این نتیجه در مطالعه‌ی حاضر عمومیت ندارد، اما در مورد سه گونه‌ی جدا شده‌ی مقاوم به فلوکونازول می‌توان ادعا کرد که اسانس خوشاریزه در از بین بردن بیوفیلم این گونه‌ها اثربخش‌تر از فلوکونازول باشد؛ این موضوع بر روی گونه در حال بررسی است و نتایج آن در مقالات آتی اعلام خواهد شد.

### References

1. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9(7): 327-35.
2. Dan M, Kaneti N, Levin D, Poch F, Samra Z. Vaginitis in a gynecologic practice in Israel: causes and risk factors. *Isr Med Assoc J* 2003; 5(9): 629-32.
3. Sobel JD, Wiesenfeld HC, Martens M, Danna P, Hooton TM, Rompalo A, et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. *N Engl J Med* 2004; 351(9): 876-83.
4. Akbarzadeh M, Bonyadpoure B, Pacshir K, Mohagheghzadeh A. Causes and clinical symptoms of vaginal candidiasis in patients referring to selective clinics of Shiraz University of Medical Sciences (2009). *J Arak Univ Med Sci* 2010; 13(3): 12-20. [In Persian].
5. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7): 2483-9.
6. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical mycology*. Churchill Livingstone: Elsevier Health Sciences; 2009.
7. Van Vuuren S. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 119(3): 462-72.
8. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007; 70(3): 461-77.
9. Akhiani H. Notes on the flora of Iran: 3. Two new records and synopsis of the new data on Iranian Cruciferae since *Flora Iranica*. *Candollea* 2003; 58(2): 369-85.
10. Avijgan M, Saadat M, Nilforoosh Zadeh M, Hafizi M. Anti-fungal effect of *Echinophora Platyloba* extract on some common Dermatophytes. *J Med Plants* 2006; 5(18): 10-6.
11. Haghghi F, Roudbar Mohammadi S, Farhadi Z. The effect of catechin on fungal biofilm formation of standard susceptible and resistant strains of *Candida albicans*. *Armaghan Danesh* 2011; 16(4): 332-40. [In Persian].
12. Madani M, Khosravi Ar, Shirani M. Comparison of the invitro effect of *Allium jesdianum*

- extracts on candida. *Journal Of Biology Science* 2009; 3(1): 63-71. [In Persian].
13. Avijgan M, Hafizi M, Saadat M, Nilforoushzadeh MA. Antifungal effect of *Echinophora Platyloba's* extract against *Candida albicans*. *Iran J Pharm Res* 2010; 5(4): 285-9. [In Persian].
  14. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86(6): 985-90.
  15. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005; 97(2): 305-11.
  16. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 564-82.
  17. Fong HH. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects. *Integr Cancer Ther* 2002; 1(3): 287-93.
  18. Schultes RE. The kingdom of plants. In: Thomson WAE, editor. *Medicines from the Earth*. New York, NY: McGraw-Hill Book Co; 1978; 208.
  19. Rechinger KH, Hedge I. *Flora Iranica*, No. 162. Graz, Austria: Akademische Druck-u Verlagsanstalt; 1987. p. 428.
  20. Nourozi M. Evaluation of photochemical and antimicrobial effect of *Echinophora platyloba* [PhD Thesis]. Tehran, Iran: Tehran University of Medical Sciences; 1989. p. 35-40. [In Persian].
  21. Muzaffariyan VA. *Dictionary of Iranian plant names*. Tehran, Iran: Farhange Muaser; 1996. [In Persian].
  22. Asghari GR, Sajjadi SE, Sadraei H, Yaghobi K. Essential oil constituents of *Echinophora platyloba* DC. *Iran J Pharm Res* 2003; 2(3): 185-6.
  23. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
  24. Galan-Ladero MA, Blanco MT, Sacristan B, Fernandez-Calderon MC, Perez-Giraldo C, Gomez-Garcia AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Med Mycol* 2010; 48(1): 207-10.
  25. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369(9577): 1961-71.
  26. Amouri I, Abbes S, Sellami H, Makni F, Sellami A, Ayadi A. The Vulvovaginal candidiasis: review. *Journal of Medical Mycology* 2010; 20(2): 108-15.
  27. Heywood VH. *Flowering plants of the world*. London, UK: BT Batsford Ltd; 1993.
  28. Renault S, De Lucca AJ, Boue S, Bland JM, Vigo CB, Selitrennikoff CP. CAY-1, a novel antifungal compound from cayenne pepper. *Med Mycol* 2003; 41(1): 75-81.
  29. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002; 292(2): 107-13.
  30. Chevallier A. *Encyclopedia of herbal medicine*. London, UK: Dorling Kindersley Publishing; 2000.
  31. Avijgan M, Saadat M and Nilforoushzadeh MA. Effect of extract of *Echinophora Platyloba* on some common dermatophytes. *Proceeding of the 2<sup>nd</sup> Symposium of Medicinal Plants*; 2005 Jan 26-27; Tehran, Iran.
  32. Arbabi Klati h, Shirzaee M, Poorzamani M, Dabiri S. Inhibitory effects of plant extracts containing thyme, clove and cinnamon compared to nystatin on *Candida albicans*. (Invitro). *J Res Dent Sci* 2012; 8(4): 175-9.
  33. Hadizadeh I, Peivastegan B, Hamzehzarghani H. Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against (*Alternaria alternate*). *American Journal of Applied Sciences* 2009; 6(5): 744-8.



## Antifungal Effect of Echinophora Platyloba Essence against the Candida Species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis, Compared with Fluconazole

Navid Aminian MSc<sup>1</sup>, Parvin Dehghan PhD<sup>2</sup>, Mostafa Chadeganipour PhD<sup>3</sup>,  
Ebrahim Sajadi PhD<sup>4</sup>, Maryam Yazdi MSc<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Candidiasis is one of the most important opportunistic human infections. These infections have been increased due to overuse of antifungal drugs, especially fluconazole. The species has shown a relative resistance to fluconazole which is the first choice of vulvovaginal candidiasis treatment. Herbs are traditional source for medicinal drugs. Study on Echinophora platyloba, a domestic Iranian medicinal plant, could be helpful to find the alternative therapeutic agent for the cure of resistant infections.

**Methods:** Clinical strains isolated from vaginal candidiasis which was identified via the method of Auxanogram with RapID™ yeast plus system. Well-diffusion assay was used to determine the susceptibility of both fluconazole and essence of Echinophora platyloba on Candida species. For obtaining minimal inhibitory concentration of 50% (MIC50) and 90% (MIC90) and minimal fungicidal concentration (MFC), different dilutions were examined and compared on different species using microdilution of fluconazole and essence. The results were evaluated according to NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) method.

**Findings:** From a total of 15 isolates, 10 (66%) were sensitive to fluconazole but 3 (14%) isolates, Candida glabrata, Candida krusei and Candida rugosa, showed resistance to this drug; meanwhile, they were dose-dependent to the essence of Echinophora platyloba. One isolate (6%) was sensitive to essence of Echinophora platyloba, whereas 7 isolates (47%) were dose-dependent and 7 (47%) were resistant to this essence. MIC50, MIC90, MFC for fluconazole and essence was observed in isolate No. 31 (Candida albicans) and maximum concentration of them was related to No. 68 (Candida krusei).

**Conclusion:** Using the essence of Echinophora platyloba along with the fluconazole would help to treat the resistant forms of candidiasis.

**Keywords:** Vulvovaginitis, Candidiasis, Fluconazole, Echinophora platyloba, Essence, Microdilution

**Citation:** Aminian N, Dehghan P, Chadeganipour M, Sajadi E, Yazdi M. Antifungal Effect of Echinophora Platyloba Essence against the Candida Species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis, Compared with Fluconazole. J Isfahan Med Sch 2014; 32(304): 1646-58

1- Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- PhD Student, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Parvin Dehghan PhD, Email: dehghan@med.mui.ac.ir

## تشخیص کاندیدیازیس واژینال با استفاده از استخراج اتوماتیک قارچ کاندیدا در تصاویر مربوط به نمونه‌های پاپ اسمیر

محمدرضا مؤمن‌زاده<sup>۱</sup>، دکتر اردشیر طالبی<sup>۲</sup>، دکتر علیرضا مهری دهنوی<sup>۳</sup>، دکتر حسین ربانی<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** کاندیدیازیس واژینال، بیماری شایع زنان است که در اثر رشد غیر طبیعی کاندیدا در مخاط دستگاه تناسلی زنان ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه، تشخیص اتوماتیک کاندیدیازیس واژینال از طریق شناسایی و استخراج قارچ کاندیدا در تصاویر میکروسکوپی مربوط به نمونه‌های پاپ اسمیر با استفاده از تکنیک‌های پردازش تصویر بود.

**روش‌ها:** فضای نمونه شامل ۲۰۰ تصویر دیجیتال میکروسکوپی بود. به منظور جمع‌آوری مجموعه‌ی تصاویر، از تعداد ۴۹ نمونه‌ی پاپ اسمیر به وسیله‌ی دوربین عکس‌برداری دیجیتال Nikon ۱ V۱ متصل به میکروسکوپ نوری Nikon Eclipse ۵۰i تصویربرداری صورت گرفت. برای یکنواخت‌سازی تصویر، از فیلتر کلاهی پیش زمینه و برای افزایش کنتراست، از ناهمبستگی رنگی به همراه کشش خطی کنتراست استفاده گردید. به منظور آستانه‌گذاری از روش آستانه‌گذاری Otsu در باند سبز تصویر استفاده گردید. برای استخراج میسلیم و کونیدیوم، از ویژگی‌های هندسی مانند مساحت، قطر بزرگ، قطر کوچک، گریز از مرکز، محیط و تراکم به وسیله‌ی دسته‌بندی درخت تصمیم استفاده گردید.

**یافته‌ها:** الگوریتم طراحی شده در تشخیص کونیدیوم قارچ کاندیدا، دارای ویژگی ۹۱/۵۴ درصد و حساسیت ۹۲/۳۲ درصد و در تشخیص میسلیم قارچ کاندیدا دارای ویژگی ۹۸/۶۴ درصد و حساسیت ۹۶/۸۸ درصد بود.

**نتیجه‌گیری:** در صورتی که این نرم‌افزار به صورت موتوریزه درآید، به جهت جلوگیری از خستگی چشم و افزایش دقت پاتالوژیست‌ها به عنوان همیار پزشک در تشخیص، قابل استفاده خواهد بود.

**واژگان کلیدی:** کاندیدیازیس، واژینال، کاندیدا، پاپ اسمیر، پردازش تصویر

**ارجاع:** مؤمن‌زاده محمدرضا، طالبی اردشیر، مهری دهنوی علیرضا، ربانی حسین. تشخیص کاندیدیازیس واژینال با استفاده از استخراج

اتوماتیک قارچ کاندیدا در تصاویر مربوط به نمونه‌های پاپ اسمیر. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۴): ۱۶۶۷-۱۶۵۹

سال‌های زندگی خود به کاندیدیازیس واژینال مبتلا می‌شوند و در حدود ۴۰-۵۰ درصد موارد، برای بار دوم عود بیماری دیده می‌شود (۴-۱).

عامل این بیماری، گونه‌های مختلف کاندیدا است که کاندیدا آلبیکنس (Candida albicans)، شایع‌ترین

#### مقدمه

کاندیدیازیس واژینال یکی از شایع‌ترین عفونت‌های دستگاه تناسلی زنان می‌باشد که روزانه در کلینیک‌های بالینی به چشم می‌خورد. تخمین زده می‌شود که ۷۵ درصد زنان حداقل یک بار در طی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوالکترونیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین علوم پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۳- دانشیار، گروه بیوالکترونیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: talebi@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر اردشیر طالبی

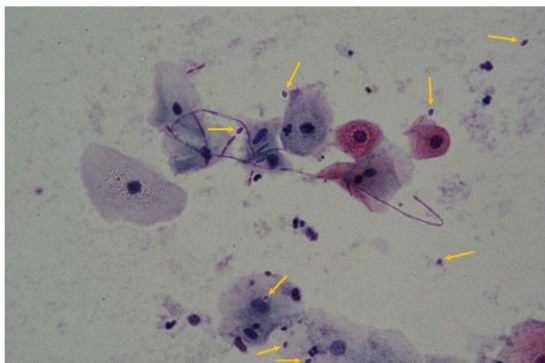
پاپانیکلاو استفاده شد و در صورت موجود بودن قارچ کاندیدا در نمونه، استخراج می‌گردید و بیماری تشخیص داده می‌شد.

قارچ کاندیدا از ۲ قسمت عمده تشکیل شده است که عبارت از میسلیموم (Mycelium) و کونیدیوم (Conidium) می‌باشند (۹).

میسلیموم رشته‌های رویشی قارچ و به صورت شاخه شاخه می‌باشند. این دسته دارای شکل‌های مختلفی می‌باشند که می‌توانند به صورت شاخه‌ای در گوشه‌ای از لام قرار گیرند و یا در حالت تهاجمی به صورت شاخه‌هایی منشعب، متراکم و در هم آمیخته باشند. این رشته‌ها در نمونه‌های پاپ اسمیر مورد استفاده به رنگ قرمز در می‌آیند.

کونیدیوم یک سلول غیر جنسی تخم مرغی شکل است که سطح خارجی آن را هاله‌ای مو مانند می‌پوشاند. در نمونه‌های پاپ اسمیر به رنگ قرمز در می‌آید.

شکل ۱ نمایش دهنده‌ی تصویری میکروسکوپی از یک نمونه‌ی پاپ اسمیر است که قسمت‌های شاخه‌ای، بخش میسلیموم قارچ و قسمت‌های تخم مرغی شکل که با فلش مشخص شده است، بخش کونیدیوم قارچ می‌باشد.



شکل ۱. نمایش میسلیموم و کونیدیوم قارچ کاندیدا آلبیکنس در یک نمونه از آزمایش پاپ اسمیر

و عامل ۹۰-۸۰ درصد موارد بیماری است. عوامل مستعد کننده‌ی اصلی در این بیماری شامل حاملگی، سرکوب سیستم ایمنی، دیابت ملیتوس کنترل نشده، مصرف قرص‌های ضد بارداری حاوی استروژن، درمان آنتی‌باکتریال، استفاده از وسایل داخل رحمی، فعالیت جنسی زیاد و نقص ایمنی موضعی ناحیه‌ی واژن می‌باشند (۵).

عمومی‌ترین علایم بیماری شامل خارش، پرخونی، سوزش، ترشح پنیری شکل، مقاربت دردناک، ترشح غیر طبیعی واژن و اریتم ناحیه‌ی واژن و ولو می‌باشد (۶). رایج‌ترین روش تشخیص، مبتنی بر مشاهده‌ی مستقیم میکروسکوپی لام پاپ اسمیر به دست آمده از بیمار به منظور یافتن میسلیموم و کونیدیوم قارچ کاندیدا می‌باشد (۷-۸).

با توجه به کوچکی اندازه‌ی قارچ کاندیدا و کم بودن گستره‌ی رنگی در تصاویر مربوط به نمونه‌های پاپ اسمیر، پیمایش سطح لام در زیر میکروسکوپ برای یافتن قارچ کاندیدا نیاز به دقت، حوصله و تجربه‌ی بسیار دارد. بنابراین تشخیص میکروسکوپی کاندیدا فرایندی خسته کننده و زمان‌بر است و نیاز به فردی متخصص برای انجام این کار دارد. در نتیجه، آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیازمند افزایش قابلیت‌های خود جهت تشخیص سریع این مخمر با تکیه بر روش‌های ساده، معتبر و ارزان با حساسیت بالا می‌باشند. استفاده از تشخیص کامپیوتری که مبتنی بر تکنیک‌های پردازش تصویر و نرم‌افزاری می‌باشد، علاوه بر سادگی و ارزانی سبب صرفه‌جویی در زمان و افزایش دقت در تشخیص بیماری می‌گردد. در این مطالعه از خصوصیات فنوتیپی و مورفولوژی قارچ کاندیدا در نمونه‌های پاپ اسمیر با رنگ‌آمیزی

## روش‌ها

در این مطالعه نمونه‌ها به دو گروه دارای قارچ کاندیدا (نتیجه‌ی آزمایش مثبت) و بدون قارچ کاندیدا (نتیجه‌ی آزمایش منفی) تقسیم می‌شدند. از این رو، برای میزان خطای مجاز در محاسبات (کمتر از ۰/۱۴)، مقدار حجم نمونه برابر با ۴۹ نمونه تعیین شد.

تعداد نمونه‌ی مورد نیاز، از بین نمونه‌های پاپ اسمیر موجود در آزمایشگاه پاتولوژی المهدی انتخاب گردید. نحوه‌ی انتخاب نمونه‌ها برای آموزش طبقه‌بندی کننده به این صورت بود که ابتدا پزشک به صورت چشمی و با استفاده از میکروسکوپ نوری از وجود قارچ در لام اطمینان حاصل می‌نمود، سپس آن لام به عنوان نمونه در اختیار قرار داده می‌شد تا از نواحی مختلف آن به وسیله‌ی دوربین عکس‌برداری دیجیتال Nikon ۱ V۱ متصل به میکروسکوپ نوری Nikon Eclipse ۵۰i با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ تصویربرداری صورت گیرد. تصاویر به دست آمده دارای فرمت jpg در سیستم رنگی sRGB و رزولوشن ۲۵۹۲ × ۳۸۷۲ بودند. کلیه‌ی تصاویر استفاده شده در آدرس اینترنتی <http://misp.mui.ac.ir/fa/Pop-Smear%20Images> موجود می‌باشند. در این مطالعه از تعداد ۲۰۰ تصویر استفاده شد که از ۱۰۰ تصویر برای طراحی الگوریتم تشخیصی و از تعداد ۱۰۰ تصویر دیگر برای آزمایش الگوریتم استفاده شد. نحوه و روند اجرای الگوریتم در شکل ۲ نشان داده شده است.

## ۱- پیش پردازش

## ۱-۱- حذف نویز

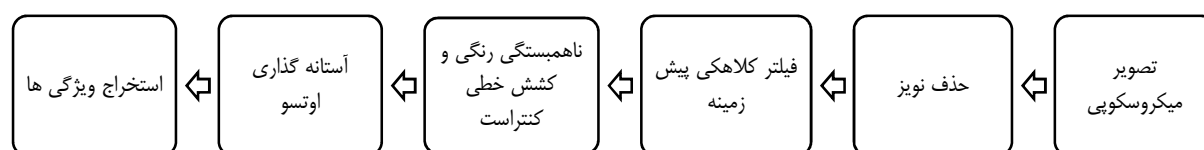
در مرحله‌ی پیش پردازش برای حذف نویز روشنایی در تصاویر میکروسکوپی، از فیلتر میانه (Median filter) بر روی هر ۳ بانده رنگی قرمز، سبز و آبی استفاده شد. همچنین برای کاهش نویز گاوسی و ایجاد تصویری یکنواخت، فیلتر وینر (Wiener filter) بر روی هر ۳ بانده رنگی اعمال گردید (۱۱-۱۲).

## ۱-۲- جداسازی پس زمینه و یکنواخت‌سازی شدت

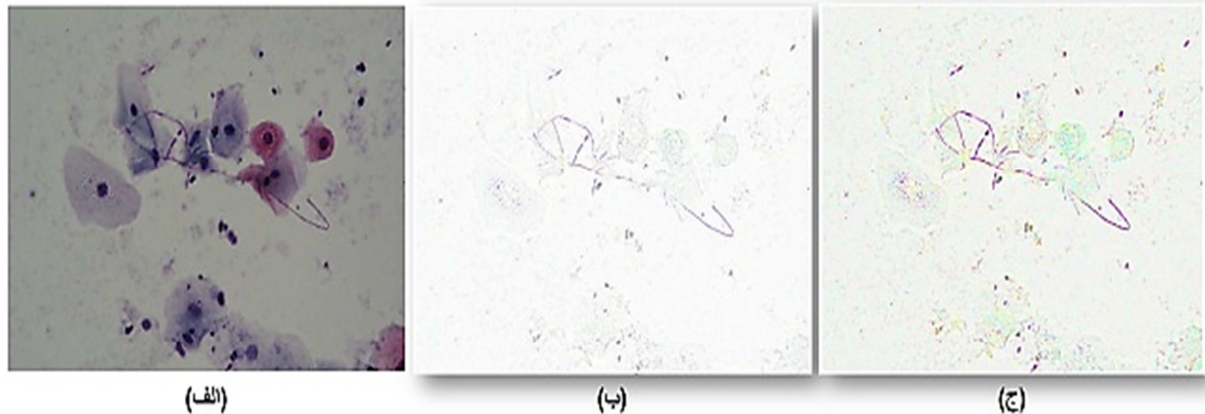
## روشنایی

با توجه به این که میسلیم و کونیدیوم قارچ کاندیدا در پیش زمینه‌ی تصویر قرار می‌گیرند، در اولین قدم از تبدیل کلاهکی پیش زمینه (Bottom-hat transform) استفاده می‌گردد (۱۳-۱۴). خاصیت تبدیل کلاهکی پیش زمینه، استخراج خطوط و اسپات‌های دره‌ای شکل است. همچنین استفاده از این تبدیل، باعث یکنواخت شدن شدت روشنایی تصویر می‌شود. تابع تبدیل به صورت رابطه‌ی (۱) می‌باشد که در آن،  $f$  تصویر مورد پردازش، اپراتور "•" معرف عملیات مورفولوژی بسته نمودن (Closing operation) و  $s$  معرف عنصر سازنده می‌باشد که کنترل کننده‌ی نحوه و میزان انجام عملیات است. در این مطالعه، از عنصر سازنده‌ی لوزی با شعاع ۲۵ پیکسل استفاده شد.

$$H_{\text{bottom}} = (f \bullet s) - f \quad (1)$$



شکل ۲. بلوک دیاگرام روش اجرای الگوریتم تشخیص کاندیدبازیس واژینال



شکل ۳. (الف) نتیجه‌ی حذف نویز در تصویر شکل ۱؛ (ب) حاصل اعمال فیلتر کلاهی پیش زمینه؛ (ج) نتیجه‌ی اعمال ناهمبستگی رنگی و کشش خطی کنتراست

### ۱-۳- افزایش کنتراست

تصاویر به دست آمده از نمونه‌های پاپ اسمیر، دارای چندین کانال رنگی می‌باشد، اما گستره‌ی رنگی در آن بسیار کم است. به همین جهت، برای افزایش تفکیک پذیری و بهبود کنتراست تصویر، از ناهمبستگی رنگی (De-correlation stretching) به همراه کشش خطی کنتراست (Linear contrast stretching) استفاده گردید (۱۷-۱۵). ناهمبستگی رنگی، باعث افزایش گستره‌ی باندهای رنگی شد و تصویر جدید در گستره‌ی رنگی وسیع‌تری قرار گرفت. همچنین استفاده از کشش خطی کنتراست بر روی هر یک از باندهای رنگی، باعث بهبود کنتراست و افزایش تفکیک پذیری رنگی شد و نمایش و تفسیر میسلایوم‌ها و کونیدایوم‌ها را آسان‌تر نمود. شکل ۳ نمایش دهنده‌ی اعمال مراحل پیش پردازش بر روی تصویر شکل ۱ می‌باشد.

### ۲- بخش بندی

#### ۲-۱- آستانه گذاری

برای آستانه گذاری از روش آستانه گذاری Otsu بر روی باند سبز رنگی تصویر استفاده شد؛ چرا که

کونیدایوم و میسلایوم بر روی باند سبز، نمود و نمایش بهتری را از خود نشان می‌دهند (۱۹-۱۸). یک تصویر مقیاس خاکستری که در آن  $g(x,y) \in (0-255)$  شدت پیکسل در مکان  $(x,y)$  را نشان می‌دهد، در نظر بگیرد. در تکنیک‌های آستانه گذاری کلی، هدف محاسبه‌ی آستانه برای پیکسل‌ها می‌باشد؛ به طوری که:

$$o(x,y) = \begin{cases} 0 & \text{if } g(x,y) \leq t \\ 255 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (2)$$

در روش Otsu، حد آستانه بر اساس هیستوگرام تصویر استخراج می‌شود. نحوه‌ی عملکرد این روش بدین صورت است که تصویر به دو کلاس اصلی پس زمینه و پیش زمینه فرض می‌گردد و روش کار سعی در یافتن بهترین آستانه برای تقسیم هیستوگرام به دو کلاس است. بنابراین، مقدار  $t$  با استفاده از حداقل سازی واریانس درون کلاسی مطابق رابطه‌ی (۳) به دست می‌آید:

$$\sigma_w^2(t) = q_1(t) \sigma_1^2(t) + q_2(t) \sigma_2^2(t) \quad (3)$$

که در آن  $\sigma_w^2$  واریانس درون کلاسی،  $\sigma_1^2$  واریانس کلاس اول و  $\sigma_2^2$  واریانس کلاس دوم می‌باشد. شکل ۴ نمایش دهنده‌ی نتیجه‌ی آستانه گذاری Otsu بر شکل ۳ می‌باشد.

۳- قطر کوچک (Minor axis): بیشترین مسافت عمود بر قطر بزرگ می‌باشد. با توجه به این که میسلایوم‌ها دارای ضخامت معینی می‌باشند، این ویژگی در تشخیص آن‌ها بسیار مفید است.



شکل ۵. نمایش قطر بزرگ (a) و قطر کوچک (b)

۴- گریز از مرکز (Eccentricity): به صورت رابطه‌ی (۴) تعریف می‌شود:

$$e = \sqrt{1 - (b/a)^2} \quad (4)$$

۵- محیط (Perimeter): به صورت طول کانتور در نظر گرفته شده در اطراف کاندیدا می‌باشد.

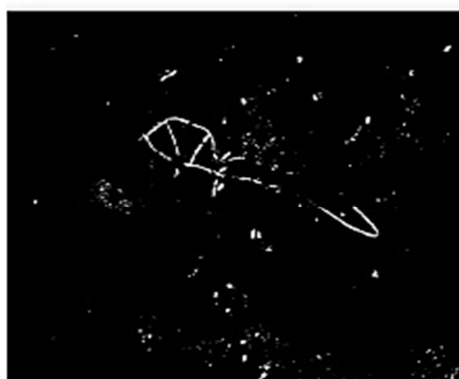
۶- تراکم (Compactness): نسبت مجذور محیط به مساحت می‌باشد که به صورت رابطه‌ی (۵) تعریف می‌شود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تراکم یک نسبت بدون مقیاس است و به اسکیل و جهت قرارگیری شیء وابستگی ندارد.

$$\text{compactness} = \frac{\text{perimeter}^2}{\text{area}} \quad (5)$$

خصوصیات استخراج شده برای میسلایوم و کونیدیوم به صورت مجزا در ساختار درخت تصمیم (Decision tree) قرار داده شد و به صورت ترکیب دو الگوریتم جدا برای دسته‌بندی میسلایوم و کونیدیوم مورد استفاده قرار گرفت (۲۲-۲۴). شکل ۵، نشان دهنده‌ی نحوه‌ی استخراج میسلایوم و کونیدیوم کاندیدا و در نهایت ترکیب دو الگوریتم می‌باشد.



(الف)



(ب)

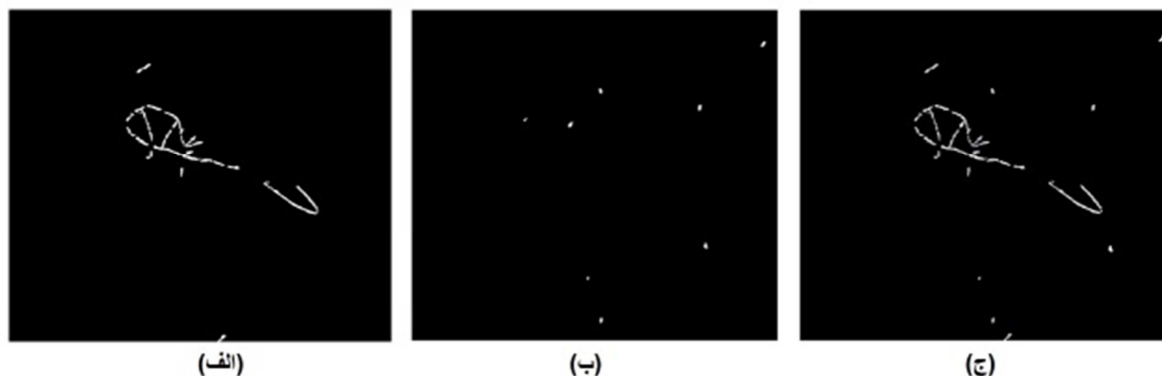
شکل ۴. (الف) تصویر شکل ۳- (ب) در باند سبز؛ (ب) نتیجه‌ی آستانه‌گذاری Otsu

### ۳- استخراج ویژگی

برای استخراج ویژگی‌های میسلایوم و کونیدیوم قارچ کاندیدا از تصاویر نمونه‌ی پاپ اسمیر، از ویژگی‌های زیر استفاده شد (۲۰-۲۱):

- ۱- مساحت (Area): تعداد پیکسل‌هایی است که کاندیدای مورد نظر را در بر می‌گیرد. از این ویژگی برای حذف اشیای خیلی بزرگ و یا خیلی کوچک یافت شده استفاده می‌شود.
- ۲- قطر بزرگ (Major axis): بیشترین فاصله بین ۲ نقطه در کاندیدای یافت شده می‌باشد. از این ویژگی، تنها در استخراج کونیدیوم استفاده شده است.





شکل ۵. (الف) نمای استخراج میسلیموم؛ (ب) نمای استخراج کونیدیوم؛ (ج) مجموع ۲ تصویر (الف) و (ب)

قارچ کاندیدا می‌باشند، اما توسط الگوریتم به اشتباه به عنوان قارچ کاندیدا شناخته نشده‌اند. جدول ۱ بیانگر ویژگی و حساسیت الگوریتم تشخیصی ارائه شده می‌باشد.

جدول ۱. نتایج الگوریتم تشخیصی

نوع تشخیص	ویژگی (درصد)	حساسیت (درصد)
کونیدیوم	۹۱/۵۴	۹۲/۳۲
میسلیموم	۹۸/۶۴	۹۶/۸۸

### بحث

کاندیدیازیس واژینال یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قارچی زنان و علت مراجعات مکرر آنان به کلینیک است که باعث تحمیل هزینه‌های درمانی برای بیماران می‌گردد. تشخیص به موقع و دقیق بیماری می‌تواند از صرف هزینه‌های درمانی و مراجعات مکرر بیماران بکاهد. در این مطالعه، روشی اتوماتیک برای تشخیص این بیماری ارائه گردیده است. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول ۱، روش اتوماتیک ارائه شده دارای ویژگی و حساسیت بالای ۹۰ درصد است و بنابراین روشی معتبر برای تشخیص

### یافته‌ها

الگوریتم طراحی شده برای تشخیص کاندیدیازیس واژینال بر روی ۱۰۰ تصویر آزمایش گردید. در مجموع، علاوه بر این که نتایج با نظر پزشک متخصص مقایسه شدند، به منظور بررسی دقت و صحت نتایج به دست آمده به صورت آماری، پارامترهایی چون حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) بر روی داده‌ها محاسبه گردید (۲۵). این پارامترها بر اساس روابط (۶) و (۷) به دست آمدند:

$$\text{Sensitivity} = \frac{Tp}{Tp+Fn} \quad (6)$$

$$\text{Specificity} = \frac{Tn}{Tn+Fp} \quad (7)$$

که در آن  $Tp$  بیانگر نمونه‌هایی است که با توجه به نظر پزشک، قارچ کاندیدا می‌باشد و توسط الگوریتم نیز به درستی به عنوان قارچ کاندیدا شناخته شده‌اند.  $Tn$  بیانگر نمونه‌هایی هستند که با توجه به نظر پزشک قارچ کاندیدا نمی‌باشند و توسط الگوریتم به درستی به عنوان قارچ کاندیدا شناخته نشده‌اند.

$Fp$  بیانگر نمونه‌هایی است که با توجه به نظر پزشک قارچ کاندیدا نمی‌باشند، اما توسط الگوریتم به اشتباه به عنوان قارچ کاندیدا شناخته شده‌اند و  $Fn$  بیانگر نمونه‌هایی است که با توجه به نظر پزشک

Otsu در باند سبز تصویر استفاده گردید. برای استخراج میسلیم و کونیدیوم قارچ کاندیدا، از ویژگی‌های هندسی مانند مساحت، قطر بزرگ، قطر کوچک، گریز از مرکز، محیط و تراکم به وسیله‌ی دسته‌بندی درخت تصمیم استفاده گردیده است که از این ویژگی‌ها و طبقه‌بندی کننده، در تشخیص اتوماتیک سرطان دهانه‌ی رحم و همین‌طور تشخیص اتوماتیک باسیل سل استفاده شده است (۲۴-۲۳، ۱۴). در پایان در مورد تشخیص میسلیم و کونیدیوم، در صورتی که این نرم‌افزار به صورت موتوریزه درآید، به جهت جلوگیری از خستگی چشم و افزایش دقت پاتالوژیست‌ها به عنوان همیار پزشک در تشخیص، قابل استفاده خواهد بود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد محمدرضا مؤمنزاده به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۲۵۰۸ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

کاندیدیازیس واژینال می‌باشد که علاوه بر دقت تشخیصی بالا، باعث صرفه‌جویی در وقت و کاهش خستگی پزشک می‌گردد. از آن جا که برای تشخیص اتوماتیک کاندیدیازیس واژینال کار خاصی صورت نگرفته بود، از روش‌های به کار رفته در تشخیص اتوماتیک سرطان دهانه‌ی رحم (۱۴) و تشخیص اتوماتیک باسیل سل استفاده شده است (۲۴-۲۳، ۲۱-۲۰، ۱۸-۱۷).

در الگوریتم ارائه شده از تبدیل کلاهیکی پیش زمینه برای جداسازی پس زمینه‌ی تصویر استفاده شد. از این روش در تشخیص اتوماتیک سرطان دهانه‌ی رحم در تصاویر نمونه‌های پاپ اسمیر استفاده شده است (۱۴). از ناهمبستگی رنگی به همراه کشش خطی کنتراست، برای بهبود کنتراست و افزایش گستره‌ی رنگی در تصاویر پاپ اسمیر استفاده گردید که از این روش برای بهبود کنتراست در تشخیص اتوماتیک باسیل سل (میکوباکتریوم توبرکلوزیس) استفاده شده است (۱۷).

به منظور آستانه‌گذاری از روش آستانه‌گذاری

### References

1. Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152(7 Pt 2): 924-35.
2. Sobel JD. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36(1): 153-65.
3. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369(9577): 1961-71.
4. White DJ, Vanthuyne A. Vulvovaginal candidiasis. *Sex Transm Infect* 2006; 82(Suppl 4): iv28-iv30.
5. Fidel PL, Jr. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. *Trends Microbiol* 2004; 12(5): 220-7.
6. Moreira D, Paula CR. Vulvovaginal candidiasis. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; 92(3): 266-7.
7. Garcia HM, Garcia SD, Copolillo EF, Cora EM, Barata AD, Vay CA, et al. Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeasts and susceptibility to antifungal agents. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38(1): 9-12.
8. Vincent JL, Anaissie E, Bruining H, Demajo W, el-Ebiary M, Haber J, et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med* 1998; 24(3): 206-16.
9. Barnett JA. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast* 2008; 25(6): 385-417.
10. Kasiulevicius V, Sapoka V, Filipaviciute R. Sample size calculation in epidemiological studies. *Gerontologija* 2006; 7(4): 225-31.
11. Akyuz AO, Reinhard E. Noise reduction in high dynamic range imaging. *J Vis Commu Image R* 2007; 18(5): 366-76.



12. Ellenberger J. Noise reduction in digital imaging- an exploration of the state of the art. for CS525-Multimedia Computing and Communications. Colorado Springs, CO: University of Colorado; 2010.
13. Jalba C, Wilkinson HF, Roerdink BTM. Morphological hat-transform scale spaces and their use in pattern classification. *Pattern Recognition* 2004; 37(5): 901-15.
14. Gentav A, Aksoy S, Onder S. Unsupervised segmentation and classification of cervical cell images. *Pattern Recognition* 2012; 45(12): 4151-68.
15. Saleh Al-amri SS, Kalyankar NV, Khamitkar SD. Linear and non-linear contrast enhancement image. *International Journal of Computer Science and Network Security* ed. 2010.
16. Gillespie AR, Kahle AB, Walker RE. Color enhancement of highly correlated images. I. Decorrelation and HSI contrast stretches. *Remote Sensing of Environment* 1986; 20(3): 209-35.
17. Siena I, Adi K, Gernowo R, Mirnasari N. Development of algorithm tuberculosis bacteria identification using color segmentation and neural networks. *International Journal of Video and Image Processing and Network Security* 2012; 12(4): 9-13.
18. Costa MG, Costa Filho CF, Sena JF, Salem J, de Lima MO. Automatic identification of mycobacterium tuberculosis with conventional light microscopy. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008; 2008: 382-5.
19. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on* 1979; 9(1): 62-6.
20. Forero MG, Sroubek F, Cristbal G. Identification of tuberculosis bacteria based on shape and color. *Real-Time Imaging* 2004; 10(4): 251-62.
21. Hiremath PS, Parashuram B. Automatic identification and classification of Bacilli bacterial cell growth phases. *IJCA, Special Issue on RTIPPR* 2010; 1: 48-52.
22. Loh WY. Classification and regression trees. *WIREs Data Mining Knowl Discov* 2011; 1(1): 14-23.
23. Sadaphal P, Rao J, Comstock GW, Beg MF. Image processing techniques for identifying Mycobacterium tuberculosis in Ziehl-Neelsen stains. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12(5): 579-82.
24. Tadrous PJ. Computer-assisted screening of Ziehl-Neelsen-stained tissue for mycobacteria. Algorithm design and preliminary studies on 2,000 images. *Am J Clin Pathol* 2010; 133(6): 849-58.
25. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PM. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003; 56(11): 1129-35.

## Diagnosis of Vulvovaginal Candidiasis via Automatic Extraction of Candida Fungus from Pap Smear Images

Mohammadreza Momenzadeh<sup>1</sup>, Ardeshir Talebi MD<sup>2</sup>, Alireza Mehri-Dehnavi PhD<sup>3</sup>, Hossein Rabbani PhD<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a common clinical problem due to occurrence overgrowth of candida in genital system mucosa of females. The aim of this study was automatic diagnosis of vulvovaginal candidiasis via detection and extraction of candida fungus from microscopic images of Pap smear samples. We used image processing techniques to detect candida fungus.

**Methods:** The sample space consisted of 200 microscopic images. Microscopic images were prepared from 49 Pap smear samples using Nikon1 V1 camera mounted on Nikon Eclipse 50i light microscope. For uniform illumination of the images, bottom-hat filtering was used. De-correlation stretching and linear contrast stretching were used for contrast enhancement. Different geometric features such as area, major axis, minor axis, eccentricity, perimeter, compactness, and decision tree classifier were used for extraction of mycelium and conidium of candida.

**Findings:** The results of extraction of mycelium showed a specificity of 98.64% and a sensitivity of 96.88%. The corresponding values for conidium detection were 91.54% and 92.32%, respectively.

**Conclusion:** According to our findings, this software would be helpful to pathologists in the diagnosis of vulvovaginal candidiasis in prevention of eyestrain. It could increase the accuracy of diagnosis, too.

**Keywords:** Candidiasis, Vulvovaginal, Candida, Papanicolaou smear, Image processing

**Citation:** Momenzadeh M, Talebi A, Mehri-Dehnavi A, Rabbani H. **Diagnosis of Vulvovaginal Candidiasis via Automatic Extraction of Candida Fungus from Pap Smear Images.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(304): 1659-67

1- MSc Student, Department of Bioelectric and Biomedical Engineering, School of Advanced Medical Technology AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Bioelectric and Biomedical Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Ardeshir Talebi MD, Email: talebi@med.mui.ac.ir

## اینفلامازوم و نقش آنها در بیماری‌ها

امین توسلی<sup>۱</sup>، دکتر علیرضا حق پرست<sup>۲</sup>

## مقاله مروری

## چکیده

اینفلامازوم‌ها گیرنده‌های سیتوزولی هستند که توانایی شناسایی پاتوژن‌های میکروبی و سیگنال‌های خطرناک درون زاد حاصل از استرس یا آسیب سلولی را دارند. کمپلکس اینفلامازوم یا از اعضای خانواده‌ی پروتئینی NLR (Nod-like receptor) است و یا از AIM۲ (Absent in melanoma۲) که عضو خانواده‌ی پروتئینی PYHIN است، شکل می‌گیرد. فعال شدن اینفلامازوم سبب فعال شدن کاسپاز التهابی به نام کاسپاز ۱ می‌گردد که این به نوبه‌ی خود، باعث بلوغ سایتوکاین‌های التهاب‌زا می‌شود. در این مقاله، در ابتدا انواع اینفلامازوم‌های شناخته شده و ویژگی‌های ساختاری آن‌ها معرفی می‌شوند و سپس مکانیسم‌های مولکولی انواع اینفلامازوم در چندین بیماری مطرح می‌گردند. فهم این مکانیسم‌ها، علاوه بر فراهم آوردن اطلاعات ارزشمند در مورد چگونگی تکوین و گسترش این اختلالات، می‌تواند در دریافت راه‌های جدید درمانی نیز مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: اینفلامازوم، NLRP۳، نقرص، آترواسکلروسیس

ارجاع: توسلی امین، حق پرست علیرضا. اینفلامازوم و نقش آنها در بیماری‌ها. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۴): ۱۶۸۹-۱۶۶۸

## مقدمه

علاوه بر سد مکانیکی پوست، پستانداران توسط دو بازوی سیستم ایمنی، یعنی سیستم ایمنی ذاتی و سیستم ایمنی اکتسابی می‌توانند بر علیه پاتوژن‌ها مقاومت کنند. سیستم ایمنی ذاتی مسؤول آغاز دفاع ایمنی، فعال کردن سیستم ایمنی اکتسابی برای تداوم طولانی مدت، ایمنی اختصاصی آنتی ژن و نیز فعال کردن لنفوسیت‌های T و B است (۱-۲). یکی از اجزای کلیدی سیستم ایمنی پاسخ گویی با واسطه، مجموعه گیرنده‌هایی است که می‌توانند حضور محرک‌های مضر خارج یا داخل سلولی را تشخیص دهند (۳).

در این بین، گیرنده‌های PRRs

(Pattern recognition receptors) که توسط سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی بیان می‌شوند، می‌توانند بخش‌های حفاظت شده‌ی PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) و DAMPs (Danger associated molecular patterns) را شناسایی کنند (۴-۵). PRRها یا به صورت منفرد و یا به طور همگرا با هم در شناسایی سیگنال‌های مضر عمل می‌کنند و به طور معمول، به چهار خانواده‌ی اصلی تقسیم می‌شوند که شامل TLRs (Toll-like receptors)، RLRs (RIG-I-like receptors)، CLR (C-type lectin receptors) و NLRs (NOD-like receptors) هستند (۶-۸). TLRها و

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استادیار، گروه ایمنولوژی و بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

Email: haghparast@um.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر علیرضا حق پرست

دارای سه دمین می‌باشند، ابتدا دمین انتهای C غنی از تکرارهای اسید آمینه‌ی لوسین (LRRs) یا Leucine-rich repeats)، که گمان می‌رود مولکول‌های میکروبی یا میانجی‌های درون‌زاد ناشی از استرس سلولی را شناسایی می‌کند. دمین دوم که در مرکز قرار دارد، NACHT نامیده می‌شود و سبب الیگومریزاسیون و تشکیل ساختار مرکزی اینفلامازوم NLR می‌گردد. سومین بخش، یک دمین اجرایی در ناحیه‌ی N-terminal (N.t) است که برای انتقال پیام به کار گرفته می‌شود. دمین اخیر، می‌تواند شامل دمین‌های PYD (Pyrin domain)، کاسپازی (CARD) یا Caspase recruitment domain) و یا یک BIR domain (Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat) باشد. پروتئین‌های NLR حاوی دمین پائین متعلق به خانواده‌ی NLRP، دارای دمین CARD متعلق به خانواده‌ی NLRC و آن‌هایی که دارای دمین BIR هستند، متعلق به خانواده‌ی NLRB می‌باشند (۱۴-۳). پروتئین AIM<sub>2</sub> از خانواده‌ی PYHIN است و با وجود برخی شباهت‌های ساختاری با اعضای خانواده‌ی NLR، این پروتئین تنها گیرنده‌ی اینفلامازومی است که متعلق به این خانواده نیست. مشخصه‌ی AIM<sub>2</sub>، دارا بودن پائین در N.t و دمین متصل شونده به DNA در ناحیه‌ی C-terminal (C.t) به نام HIN<sub>200</sub> است. AIM<sub>2</sub> فاقد بخش CARD (ضروری برای NLRPها) است (شکل ۱) (۱۵-۱۱). بر خلاف دیگر اعضای خانواده‌ی PYHIN، AIM<sub>2</sub> در سیتوزول قرار می‌گیرد و به عنوان یک گیرنده‌ی درون سلولی برای DNA سیتوزولیک عمل می‌کند. برای شناسایی DNA در سیتوزول توسط

CLRها گیرنده‌های مرتبط به غشا هستند، اما RLRها و NLRها جزء انواع سیتوزولی PRRها می‌باشند (۹). برخی از اعضای خانواده‌ی پروتئینی NLRها و پروتئین Aim<sub>2</sub> (Absent in melanoma<sub>2</sub>) از خانواده‌ی PYHIN در تشکیل کمپلکس ماکرومولکول پروتئینی به نام اینفلامازوم نقش دارند (۱۱-۱۰). ویژگی‌های بیوشیمیایی NLRPها با کارهای اولیه‌ی گروه Tschopp و همکاران به دست آمد و سبب شد اصطلاح اینفلامازوم روی آن‌ها گذاشته شود که نشان دهنده‌ی نقش این گیرنده‌ها در التهاب است (۱۲).

فعالیت گیرنده‌های اینفلامازومی سبب فعال شدن سیستم پروتئینی به نام کاسپاز ۱ می‌شود که این نیز باعث فعال شدن pro-IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) و pro-IL-18 (Interleukin-18) و تبدیل آن به فرم سایتوکاین بالغ ترشحی می‌شود (۱۳-۳). در واقع اینفلامازومها کمپلکس‌های مولتی پروتئینی هستند که در داخل سیتوزول قرار گرفته‌اند. این کمپلکس‌ها مسؤول فعال کردن کاسپاز ۱ هستند که در پی آن، سایتوکاین‌های پیش التهابی pro-IL-1 $\beta$  و pro-IL-18 بیان و فعال می‌شوند.

### ویژگی‌های ساختاری اینفلامازوم

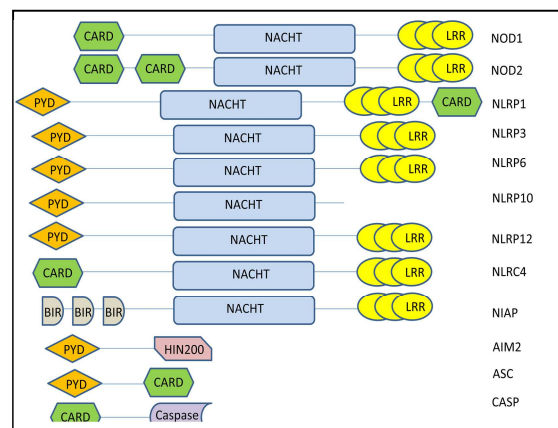
NLRها بزرگ‌ترین گروه اینفلامازومی هستند که با Znهای R در گیاهان همولوژی ساختاری و عملکردی دارند. محصول این Znها حضور پاتوژن‌ها را شناسایی می‌کند و سبب شروع فعالیت مسیر پیام‌رسانی MAPK (Mitogen-activated protein kinase) و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌گردد (۱۲-۹). NLRها PRRهای سیتوزولیک هستند و از لحاظ ساختاری

(Double stranded DNA) انجام می‌گیرد و با این اتصال دمین پایرین از خود مهاری درون مولکولی آزاد می‌گردد. هر گونه dsDNA با منشأ ویروسی، پروکاریوتی یا پستانداران می‌تواند به AIM2 متصل شود و آن را فعال کند. این حقیقت که فعال شدن AIM2 نیازی به موتیف توالی خاصی ندارد و تنها بر این مبنا که هر گونه DNA موجود در سیتوزول را شناسایی می‌کند، گویای شرایط فیزیولوژیک طبیعی است که dsDNA در بخش سیتوزولی حضور ندارد (۱۵، ۱۷-۱۸).

### مکانیسم فعال شدن اینفلامازوم

همان گونه که ذکر شد، پروتئین‌های NLR دارای شباهت‌هایی با پروتئین‌های دیگر مانند حسگرهای تشکیل دهنده آپوپتوزوم از جمله Apaf-1 انسانی، Dark در زوفیلا یا پروتئین R گیاهی هستند (۱۹-۲۱). بر این مبنا، می‌توان دو مکانیسم احتمالی برای فعالیت اینفلامازوم‌ها متصور شد. اختلاف اصلی و مهم بین این دو مدل پیام فعال کردن آن‌ها است (۲۲). مکانیسم اول بر مبنای تشکیل آپوپتوزوم است که با فعال شدن Apaf-1 در اثر اتصال مستقیم مولکول فعال کننده سیتوکروم c صورت می‌گیرد. بر طبق این مدل، NLR در همه سلول به حالت خاموش وجود دارد و به شکل یک کمپلکس خود مهاری که در آن دمین تنظیمی LRR به دمین‌های PYD و NACHT متصل است. بنابراین از معاوضه نوکلئوتیدی و بازآرایی ساختاری که سبب تشکیل حالت باز و فعال می‌شود، جلوگیری می‌گردد. اتصال مستقیم DAMP/PAMP به دمین غنی از لوسین کمپلکس NLR، سبب به هم ریختن خود

اینفلامازوم AIM2 نیازی به ویژگی ساختاری خاصی مانند موتیف توالی یا تغییرات نوکلئوتیدی نیست، اما DNA بایستی دو زنجیری و بیش از ۸۰ bp طول داشته باشد تا بتواند در تشکیل و فعال شدن اینفلامازوم AIM2 نقش آفرینی کند. از طرفی AIM2 فاقد دمین NACHT (تسهیل کننده مولتیمیزاسیون) است (۱۶).



شکل ۱. ساختار ترکیبات دخیل در اینفلامازوم. زیر مجموعه‌ی اعضای خانواده‌ی NLR و همچنین پروتئین عضو HIN200 یعنی AIM2 می‌توانند کمپلکس اینفلامازوم را به هم وصل کنند. مشخصه‌ی NLRها حضور دمین NACHT و تعداد متغیری از LRRها است. AIM2 حاوی انتهای آمینی PYD و یک دمین متصل شونده به DNA یعنی HIN200 است.

**AIM2: Absent in melanoma; ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; BIR: Baculovirus IAP repeat;**

**CARD: Caspase recruitment domain;**

**CASP: Caspase LRR leucine-rich repeat;**

**NACHT: Nucleotide-binding and oligomerization domain; NLR: Nod-like receptor; PYD: Pyrin**

در واقع، شناسایی غیر اختصاصی DNA با جذب الکتروستاتیک بین بار مثبت باقی مانده‌های دمین HIN200 و بار منفی قند-فسفات dsDNA

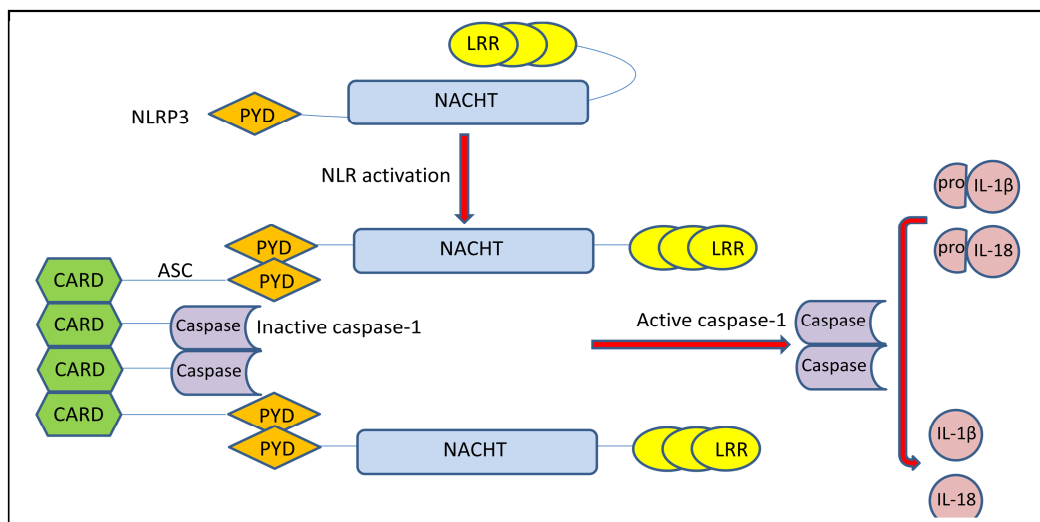
فعال می‌گردد. در هر دو مدل NLR، تحت تغییر ساختاری لازم جهت تعویض نوکلئوتید بر روی دمین NACHT قرار می‌گیرد و به دنبال آن NLR فعال می‌شود و حال از طریق دمین پایرین خود به دمین پایرین ASC بر هم‌کنش می‌کند و به این صورت، هسته‌ی ساختار اینفلامازوم شکل می‌گیرد (۲۶-۲۴).

### انواع اینفلامازوم

NLRP۱، NLRP۳ و NLRC۴ جزء زیر مجموعه‌ی خانواده‌ی NLR هستند و به طور معمول در دو شکل مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. اولین شکل، آن‌هایی هستند که حاوی دمین متصل شونده به نوکلئوتید هستند و برای خود الیگومریزاسیون نیاز به اتصال به یک ریبونوکلئوتید فسفات دارند. دومین شکل، انواع دارای نواحی غنی از لوسین هستند که به عنوان یک

مهاری NLR و ایجاد الیگومریزاسیون در آن می‌شود (۲۱).

دومین مکانیسم فرضی، فعال شدن اینفلامازوم NLR بر مبنای یافته‌های پروتئین R در گیاهان است. بر طبق این مدل، NLR در سلول میزبان در یک کمپلکس شبیه گارد قرار دارد که نه تنها در مقابل تخریب پروتئوزومی محافظت می‌شود، بلکه به حالت خاموش و غیر فعال نیز می‌باشد. در این حالت دمین تنظیمی LRR با دمین پایرین ASC واکنش می‌دهد (شکل ۲) (۲۳). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این کمپلکس گاردی ممکن است توسط SGT۱ و HSP۹۰ گیاهی که همولوگ پستانداران است، نیز شکل بگیرد. فعال شدن مستقیم و غیر مستقیم این کمپلکس گاردی توسط DAMP یا PAMP سبب گسستگی کامل یا جزئی NLR غیر



شکل ۲. مکانیسم فعال شدن اینفلامازوم. انواع اینفلامازوم توسط طیف گسترده‌ای از DAMPs و PAMPs فعال می‌گردد. NLRP۳ به عنوان مثالی از فعال شدن و تشکیل اینفلامازوم نشان داده شده است. فعال شدن NLRها با تغییرات ساختاری روی آن و اتصال به ASC از طریق دمین‌های پایرین (PYD) صورت می‌گیرد. همچنین پروتئین آداپتور ASC به پروکاسپاز ۱ از طریق دمین‌های CARD متصل می‌شود. این کمپلکس بزرگ، اینفلامازوم نامیده می‌شود تا زمینه‌ای برای خود فعالی کاسپاز ۱ فراهم گردد. در ادامه، کاسپاز ۱ فعال می‌شود و می‌تواند شکل غیر فعال (pro-IL-1β) یا IL-1β یا IL-18 را به شکل فعال تبدیل کند تا آماده‌ی ترشح و فعالیت بیولوژیکی شود

آزاد می‌گردد (۳۳). همچنین در مطالعه‌ای نشان داده شده است که ترکیبات ضد میکروبی مانند پپتید ۲R-Brevinin می‌تواند باعث افزایش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی  $\beta$ -IL-۱ و IL-۱۸ گردد (۳۴).

### اینفلامازوم NLRP۱

اولین اینفلامازومی که شناخته شد، NLRP۱ بود (۳۵). NLRP۱ به این دلیل که علاوه بر PYD، NAD، NACHT و LRRها حاوی دمین FIIND و CARD می‌باشد، در میان NLRPها منحصر به فرد است. اینفلامازوم NLRP۱ حاوی کاسپازا ۱ می‌باشد که توسط ASC و کاسپازا ۵ به طور مستقیم با CARD از NLRP۱ بر هم کنش دارند. اما نقش ASC و کاسپازا ۵ هنوز در اینفلامازوم NLRP۱ به طور کامل مشخص نیست (۳۶-۳۷). برای مثال، اگر چه کاسپازا ۵ بخشی از اینفلامازوم NLRP۱ می‌باشد، اما در دیگر اینفلامازومها از جمله اینفلامازومهای حاوی NLRP۲ و NLRP۳ وجود ندارد و به این ترتیب، ممکن است نقش مهمی در همه‌ی اینفلامازومها نداشته باشد (۱).

اگر چه NLRP۱ اولین پروتئینی بود که در کمپلکس‌های اینفلامازوم توصیف شد، اما مکانیسم فعال شدن آن به میزان کمی شناخته شده است. NLRP۱ به دلیل داشتن یک دمین اضافه در بخش C.t (عمل آن ناشناخته است) و همچنین وجود یک دمین CARD، از نظر ساختاری با سایر NLRها تفاوت دارد. NLRP۱ انسانی یک اینفلامازوم وابسته به ASC را شکل می‌دهد، در صورتی که احتمال می‌رود NLRP۱ موشی، کاسپازا ۱ را به شکل مستقل از ASC فعال کند (۳۸-۳۹، ۳۵).

دمین شناسایی لیگاند برای گیرنده‌های دیگر مانند TLR یا لیگاندهای میکروبی عمل می‌کنند (۶). پروتئین دیگری که به عنوان اینفلامازوم محسوب می‌شود، پروتئین قابل القا توسط اینترفرون است که AIM۲ نیز نامیده می‌شود. در ادامه، انواع اینفلامازومها توضیح داده می‌شود (۱).

### پروتئین‌های NOD

#### (Nucleotide-binding oligomerization domain)

NOD۱ و NOD۲ پروتئین‌هایی با چند دمین هستند که به ترتیب شامل یک یا دو دمین CARD، یک دمین NOD در مرکز و در ادامه‌ی آن تعدادی LRR در ناحیه‌ی C.t هستند (۲۷). ارتولوگ‌های این پروتئین‌ها در مهره‌داران وجود دارد، اما در حشرات و کرم‌ها وجود ندارد. اگر چه NOD۱ در بسیاری از انواع سلول‌ها و اندام‌ها وجود دارد، اما NOD۲ محدودتر است و در ماکروفاژها، DCها (۲۸) و سلول‌های Paneth (۲۹)، کراتینوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیالی روده‌ای و ریه وجود دارد (۳۰). هر دوی این‌ها در سیتوزول بیان می‌شوند و بخشی از آن‌ها با غشای پلاسمایی در ارتباط هستند (۳۱).

فعال شدن هر دوی این پروتئین‌ها سبب فعال شدن مسیر B NF $\kappa$  و MAPK می‌شود که این‌ها نیز در بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی ذاتی و اکتسابی نقش دارند. NOD۱ و NOD۲ گیرنده‌های سیتوزولیکی هستند که بخش‌های PGN (Peptidoglycan) دیواره‌ی باکتری‌ها را می‌شناسند (۳۲). در واقع، قطعات PGN یا در طی تقسیم باکتری در سیتوزول سلول ایمنی آلوده و یا از لیزوزومی که آن را فاگوسیتوز کرده و در لیزوزوم میزبان تخریب می‌کند،



سبب فعال شدن NLRP3 شوند (۵۲-۴۹). تنوع ساختاری عوامل القا کننده‌ی NLRP3 همان گونه که ذکر شد تا حد زیادی شناخته شده است، اما مکانیسم فرا دست آن که سبب الیگومریزاسیون NLRP3 می‌شود، ناشناخته مانده است (۱۸).

اینفلامازوم NLRP3 می‌تواند به طیف گسترده‌ای از محرک‌ها پاسخ دهد و به طور معمول، این فعال کننده‌ها فاقد تشابه ساختاری و عملکردی هستند (۵۳). بسیاری از میکروب‌ها مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و تک یاخته‌های انگلی می‌توانند اینفلامازوم NLRP3 را فعال کنند. علاوه بر فعال کننده‌های میکروبی، سیگنال‌های خطرناک درونی شامل ATP، اورات منوسدیم و آمیلوئید  $\beta$  اینفلامازوم NLRP3 را فعال می‌کنند. گمان می‌رود NLRP3 نقش اولیه در دفاع از میزبان در مقابل پاتوژن‌ها را داشته باشد و همانند TLR در شناسایی اختصاصی PAMP، علاوه بر شناسایی طیف وسیعی از پاتوژن‌ها، قدرت تشخیص حداقل یک اثر اصلی عفونت یعنی آسیب سلولی را نیز دارند (۵۴). توالی‌یابی ژنوم توتیای دریایی نشان می‌دهد که دارای ۲۲۲ ژن برای TLR و ۲۰۳ ژن برای NLR است که ثابت کننده‌ی اهمیت این گیرنده‌های سیستم ایمنی ذاتی در گونه‌های پست از جمله خارپوستان می‌باشد (۵۵). همان‌طور که گونه‌ها تکامل یافته‌اند و سیستم ایمنی اکتسابی (در مهره‌داران) تکامل یافته است، بعضی از این NLRهای ذاتی اولیه علاوه بر نقش داشتن در پایش پاتوژن، اعمال دیگری مانند پاسخ به استرس‌های متابولیک، ایسکمی و تروما نیز دارند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ممکن است اینفلامازوم NLRP3 نقش مهمی در نارسایی‌های

بهترین ویژگی شناخته شده از فعالیت NLRP1 در عملکرد سم کشنده‌ی آنتراکس است. زیر واحد آنتی‌ژن حفاظتی سبب ورود زیر واحد «عامل کشنده» به درون سیتوزول سلول می‌شود. در نتیجه با فعال کردن کاسپاز ۱ از طریق NLRP1، سبب القای سریع مرگ سلول می‌شود (۴۰). فعالیت اندوپروتنازی عامل کشندگی، فعال شدن NLRP1 را تغییر می‌دهد. این عامل سوبستراهای سیتوزولی را در فرایندی که نیازمند جریان کلسیم و فعالیت پروتئوزوم است، برش می‌زند (۴۱). انسان حامل یک ژن برای NLRP1 است؛ در صورتی که در موش، سه پارالوگ برای آن وجود دارد (۱).

#### اینفلامازوم NLRP3

NLRP3 با ASC و کاسپاز ۱ می‌تواند اینفلامازوم را شکل دهد و بیشترین مطالعه در بین اعضای خانواده‌ی NLR روی آن صورت گرفته است (۴۲). اینفلامازوم NLRP3 در شناسایی باکتری پاتوژن Plethora مانند *E. coli* یا *S. aureus* (۴۳)، پاتوژن‌های ویروسی مانند آنفولانزای A (۴۴) و پاتوژن‌های قارچی مانند *Candida albicans* (۴۵) نقش دارد. ترکیباتی از پاتوژن‌ها که سبب فعال شدن NLRP3 می‌شوند، شامل عوامل قادر به تشکیل سوراخ در غشای سلول میزبان یا یودوفوریک باکتریایی مانند LLO یا Nigericin (۴۶-۴۷) یا عوامل ویروسی مانند کانال M2 از ویروس آنفولانزای A هستند (۴۸). علاوه بر این، DAMP‌های درون‌زاد مانند ATP خارج سلولی، کریستال‌های اوریک اسید مرتبط به نقرص و ترکیبات محیطی مانند کریستال‌های سیلیکا یا فیبرهای آزبست، می‌توانند



(۵۹-۶۱). در تجربیات دیگری نشان داده شده است که قارچ *C. albicans* با سیگنالینگ تیروزین کیناز Syk سبب فعال شدن NLRP۳ و بنابراین فعال شدن کاسپاز ۱ و ترشح  $IL-1\beta$  سبب ایجاد جریان پتاسیم می‌شود (۴۵، ۶۲).

مطالعات دیگری نشان می‌دهد که Hemozoin که یک کریستال هم (Heme) تولید شده توسط مالاریا است و سبب فعال شدن اینفلامازوم NLRP۳ با ایجاد سیگنال خطر در مسیر کیناز Lyn/Syk می‌گردد (۶۳-۶۴). همچنین ناپایدار کردن لیزوزوم با کریستال‌های سیلیکا، فیبریل‌های آمیلوئید بتا و نمک‌های آلوم می‌تواند باعث فعال شدن اینفلامازوم NLRP۳ شود که این نیز سبب تخریب لیزوزوم و آزادسازی پروتئاز لیزوزومی، همانند کاتپسین B می‌شود که تا حدی سبب شناسایی اینفلامازوم NLRP۳ می‌گردد (۵۰، ۵۲، ۶۵).

انگل لیشمانیا درون ماکروفاژها تکثیر می‌کند و مکانیسم اولیه‌ی مقاومت در برابر این انگل تولید نیتریک اکسید (NO) است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که در پاسخ به عفونت لیشمانیا در ماکروفاژها، اینفلامازوم NLRP۳ فعال می‌شود و با تولید  $IL-1\beta$  باعث فعال شدن آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز و بنابراین تولید NO می‌گردد. NO تولید شده سبب محدود شدن تکثیر این انگل در ماکروفاژها می‌شود (۶۶).

#### اینفلامازوم NLRP۶ و NLRP۱۲

NLRP۶ با ASC و کاسپاز ۱ مرتبط است و می‌تواند باعث فعال شدن NF $\kappa$ B شود. فعالیت NLRP۶ با محور  $ASC/caspase-1/IL-18$  حفظ می‌گردد (۶۷). در موش‌های فاقد NLRP۶، تغییرات کیفی و

متابولیک و عدم پاسخ‌های التهابی بازی کند که از آن جمله می‌توان به دیابت نوع ۲، نقرص، بیماری آلزایمر و ایسکمی اشاره داشت (۵۶، ۵۰، ۴۰، ۲۵). همچنین Compan و همکاران شواهدی ارائه کردند که نشان می‌داد اینفلامازوم NLRP۳ می‌تواند با تورم سلولی فعال شود (۵۷).

سلول‌های نکروتیک، DAMP‌های درون‌زاد را که به عنوان زنگ خطر برای سیستم ایمنی ذاتی است، در بافت آزاد می‌کنند. آزادسازی ATP از سلول‌های نکروتیک، پیغام خطری است که سبب فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی می‌گردد. ATP به گیرنده‌ی P2X۷ در سلول‌های ماکروفاژی متصل می‌گردد که سبب شروع تشکیل همی کانال Pannexin-۱ شده که نتیجه‌ی آن فعال شدن اینفلامازوم NLRP۳ تحریک کاسپاز ۱ و آغاز ترشح  $IL-1\beta$  از سلول می‌باشد. (۴۶، ۵۸). مطالعات دیگری روی سلول‌های توموری نشان می‌دهد تیمار این سلول‌ها با عوامل شیمی درمانی از جمله Oxaliplatin سبب فعال شدن اینفلامازوم NLRP۳ در سلول‌های دندریتیک می‌گردد که این باعث ترشح  $IL-1\beta$  از آن‌ها می‌شود (۵۸).

مطالعات مختلفی نشان می‌دهد اینفلامازوم NLRP۳ در پاسخ به عفونت‌های میکروبی فعال می‌گردد. برای مثال باکتری‌هایی مانند *S. aureus* و *L. monocytogenes* می‌توانند با تأثیر توکسین *disteriolysin-O*، آلفا توکسین، بتا توکسین و گاما توکسین با ایجاد جریان  $K^+$  به سمت خارج سلول، سبب فعال شدن اینفلامازوم NLRP۳ شوند (۴۶). اینفلامازوم NLRP۳ همچنین می‌تواند باعث فعال شدن ویروس سندای و آنفولانزای نوع A شود که موجب ترشح  $IL-1\beta$  وابسته به کاسپاز ۱ می‌گردد

NLR $\chi$  می‌شود، فلاژلین یا PrgJ باکتریایی است که به طور معمول با همکاری پروتئین‌های دیگری به نام NAIP صورت می‌گیرد. در واقع، ابتدا این اجزای باکتریایی به انواعی از NAIP متصل می‌شوند و باعث فعال شدن اینفلامازوم NLR $\chi$  می‌گردند (۷۳-۷۲).

### پروتئین NLRP10

بر خلاف اعمال درک شده‌ی NLRها در ایمنی، بعضی از ۲۲ عضو این خانواده‌ی پروتئینی اعمال ناشناخته‌ای دارند. در این میان، NLRP10 تنها NLRی است که فاقد بخش LRR است. این موضوع به طور ضمنی بیانگر اعمال آداپتوری یا تنظیمی این پروتئین بیش از نقش گیرندگی برای PAMPها و DAMPها است (۷۴). NLRP10 انسانی ابتدا توسط Wang و همکاران شناخته شد (۷۵). NLRP10 در کلیه، بیضه و روده‌ی بزرگ انسان و موش بیان می‌گردد (۷۶). این پروتئین در پوست انسان به ویژه در اپیدرم به فراوانی بیان می‌گردد. mRNA در ماکروفاژها، DCها، T-cell، CD4 $^{+}$  B-cellها و نوتروفیل‌ها نیز بیان می‌گردد (۷۵).

این NLR به شکل اینفلامازوم در نمی‌آید و نقشی غیر معمول اما مهم در مهاجرت سلول‌های دندریتیک (DCs یا Dendritic cells) دارد. موش‌های دارای نقص در NLRP10 در مهاجرت DCها به غدد لنفی (LN یا Lymph nodes) در طی ایمنی‌زایی با طیف گسترده‌ای از ادجوانت‌ها در چندین سایت و در نتیجه، القای سلول T کمکی CD4 $^{+}$  دچار مشکل هستند (۷۷). از طرفی نشان داده شده است که NLRP10 در سایت ورودی باکتریایی که در کنار پروتئین NOD-1 است، پیدا می‌شود. بر مبنای این

کمی در اکولوژی میکروبی دستگاه گوارشی مشاهده شده است. همچنین در موش‌های دارای نقص در ASC، کاسپاز ۱ و IL-18 نیز این مشکلات عدم تعادل دیده می‌شود. حضور NLRP6 باعث مهار جریان منوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها به گردش خون و Peritoneum به سبب ممانعت از تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها در طی عفونت‌های باکتریایی با تنظیم منفی MAPK و NF $\kappa$ B القا شده توسط TLR می‌گردد (۶۸، ۱۸).

NLRP12 با ASC و کاسپاز ۱ اینفلامازومی را شکل می‌دهد که سبب بلوغ IL-1 $\beta$  می‌شود. به طور حتم، دانش ما در مورد نقش NLRP12 در سلامتی و بیماری‌ها محدود است (۶۹).

### اینفلامازوم NLR $\chi$

پروتئین NLR $\chi$  اینفلامازوم را در عفونت با انواع باکتری‌های گرم منفی مانند *Salmonella typhimurium* در ماکروفاژها تشکیل می‌دهد (۷۰). NLR $\chi$  حاوی یک دمین CARD در N.t برای انتقال پیام، یک دمین مرکزی NACHT و یک دمین LRR در C.t است که با دمین CARD پیش کاسپاز ۱ در واکنش CARD-CARD به طور اختصاصی ارتباط دارد (۷۱).

این اینفلامازوم به طور معمول از طریق اجزای سیستم ترشحی نوع III باکتریایی تشکیل می‌گردد. این سیستم ترشحی چندین عامل سمی باکتریایی را به داخل سلول میزبان وارد می‌کند تا فرایندهای مشخصی از میزبان مانند سیستم ایمنی ذاتی تخریب گردد و همانندسازی باکتریایی پیش رود. از جمله اجزای این دستگاه که باعث فعال شدن اینفلامازوم

*Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* و سوش‌های مشخصی از *Legionella pneumophila* نیز می‌توانند سبب فعال شدن AIM2 شوند (۸۴-۸۲).

### بیماری‌های مرتبط با اینفلامازوم

#### آلزایمر

مطالعات اخیر نشان می‌دهد پپتید درون‌زاد آمیلوئید  $\beta$  که فیبریل‌های غیر محلول در مغز بیماران دچار بیماری آلزایمر را ایجاد می‌کند، می‌تواند سبب فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 گردد.  $A\beta$  به عنوان یک سیگنال درون‌زاد خطرناک است که توسط اینفلامازوم NLRP3 شناسایی می‌شود. در واقع اینفلامازوم NLRP3 به عنوان یک گیرنده‌ی عمومی عمل می‌کند که توانایی شناسایی پپتیدها و پروتئین‌های تجمع یافته را در سلول دارد و علاوه بر  $A\beta$  تجمع یافته، توانایی شناسایی تجمعات پروتئینی پاتورنی از قبیل Amyloidosis در پارکینسون را نیز دارد و سبب پاسخ‌های التهابی می‌گردد (۸۵، ۵۰).

نتایج پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که ویژگی فیبریلار  $A\beta$  در شناسایی و فاگوسیتوز توسط سلول‌های میکروگلیال ضروری است. این شناسایی توسط گیرنده‌های NLRP3 صورت می‌گیرد. سپس این سلول‌های فاگوسیت کننده که دارای لیزوزوم‌های حاوی  $A\beta$  هستند، متحمل آسیب‌های ساختاری و عملکردی می‌شوند، برای مثال pH لیزوزوم حاوی  $A\beta$  کاهش می‌یابد. بنابراین لیزوزوم شروع به آزادسازی ترکیبات درونی می‌کند. از جمله‌ی این ترکیبات کاتپسین B است که به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود و سبب فعال کردن کاسپاز ۱ و پس از آن فعال شدن  $IL-1\beta$  می‌شود تا ترشح مولکول‌های پیش

یافته و یافته‌های مربوط به مهاجرت در بافت‌های التهابی، می‌توان نقش NLRP10 را در تنظیم فرایندهای اسکلت سلولی پیشنهاد داد. همچنین مطالعاتی دیگر نشان می‌دهد در سلول‌های اپیتلیال، NLRP10 در ایمنی ذاتی بر علیه عفونت‌های باکتریایی نیز فعال می‌گردد (۷۸).

### فعال شدن اینفلامازوم توسط AIM2

مطالعات اخیر نشان می‌دهد dsDNA توسط یک عضو خانواده‌ی PYHIN به نام AIM2 شناسایی می‌شود (۱۰). اگر چه این اینفلامازوم جزء خانواده‌ی NLRها نیست، اما AIM2 با دمین C.t به dsDNA متصل می‌شود و با ASC از طریق دمین N.t پایرین الیگومریزه می‌شود و بر هم کنش دارند. این واکنش سبب تشکیل پایروپتوزوم ASC یا اینفلامازوم AIM2 می‌گردد که سرانجام باعث فعال شدن کاسپاز ۱ و B NFK می‌شود (۷۹، ۱۱).

اگرچه در گذشته ثابت شده است وقتی DNA به طور مناسب تخریب نشود یا از فضای خارج سلولی پاک نگردد، می‌تواند تجمع یابد یا در دسترس بخش‌های سیتوزولیک قرار گیرد، اما فعالیت AIM2 برای DNA درون‌زاد هنوز در بیماری‌های فیزیولوژیک ثابت نشده است. چندین مهاجم میکروبی می‌توانند به سیتوزول سلول‌های فاگوسیتیک دسترسی پیدا کنند و DNA خارجی را آزاد کنند و فعالیت AIM2 و بنابراین کاسپاز ۱ را راه‌اندازی نمایند (۸۰). این موضوع برای DNA ویروس واکسینیا و MCMV (Maize chlorotic mottle virus) نیز اثبات شده است (۸۱). همچنین مطالعاتی نشان می‌دهد که DNA آزاد شده در سیتوزول باکتری‌های

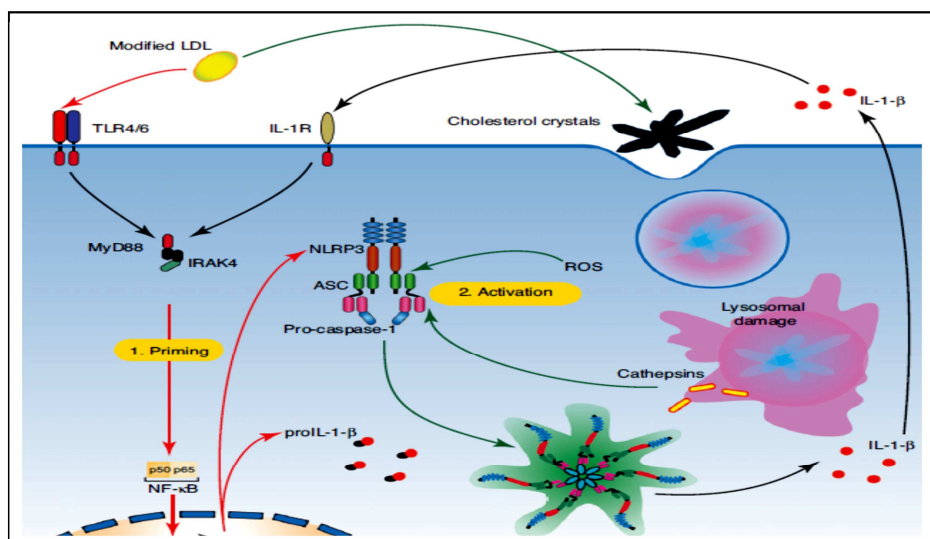
التهابی در بیماری آلزایمر آغاز گردد (۸۷-۸۶).

### بیماری آترواسکلروسیس

این بیماری در دیواره‌ی سرخرگ‌های بزرگ شکل می‌گیرد و می‌تواند سبب انفارکتوس میوکاردیال شود. یکی از مشخصه‌های این بیماری، درگیر شدن سلول‌های ایمنی در دیواره‌ی سرخرگ‌ها است (۸۸). از طرفی، مطالعات نشان می‌دهد آترواسکلروسیس توسط ترکیبات درون‌زاد نیز می‌تواند پیش رود. یکی از این ترکیبات درون‌زاد مرتبط با آترواسکلروسیس کلسترول است؛ به طوری که افزایش سطوح کلسترول خون با تکوین بیماری آترواسکلروتیک ارتباط مستقیم دارد. کلسترول در این بیماری هم به شکل استرهای کلسترول در داخل سلول‌های ماکروفاژی و هم به صورت کلسترول کریستالی در داخل و خارج سلول‌ها وجود دارد. کلسترول در محلول‌های آبی حلالیت کمی دارد، بنابراین کریستال‌های کلسترول در رنگ‌آمیزی‌های بافتی به صورت شکافت‌های کریستالی کلسترول قابل

شناسایی است (۹۰-۸۹).

فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 در آترواسکلروسیس. ابتدا LDL (Low-density lipoprotein) تغییر یافته از طریق گیرنده‌های TLR و Scavenger روی ماکروفاژها شناسایی می‌شوند. این مرحله‌ی Priming سبب افزایش بیان NLRP3 و pro-IL-1 $\beta$  می‌شود. در پی آن کریستال‌های کلسترول حاصل از LDL تغییر یافته که توسط ماکروفاژها فاگوسیتوز شده‌اند، سبب تخریب لیزوزوم و آزادسازی پروتئازهای لیزوزومی (کاتاپسین‌ها) می‌شوند. کاتاپسین‌ها همچنین در ترکیب با ROS (Reactive oxygen species) فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 را تعدیل می‌کنند که نتیجه‌ی آن برش کاسپاز ۱ و تولید سیتوکین IL-1 بالغ و فعال است. سپس IL-1 از سلول آزاد می‌گردد تا سبب تداوم بیان اینفلامازوم و همچنین واسطه‌گری در پاسخ التهابی شود که نتیجه‌ی آن جریان سلول‌های ایمنی و پیش روی تشکیل پلاک‌های آترواسکلروتیک است (شکل ۳) (۹۰).



شکل ۳. مسیر پیشنهادی فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 (Nod-like receptor P3Nod-like receptor) در آترواسکلروسیس

در مطالعات *In vitro* نشان داده شده است که ماکروفاژها در پاسخ به کریستال‌های کلسترول از مسیر وابسته به اینفلامازوم NLRP3 می‌توانند میزان زیادی IL-1 $\beta$  ترشح کنند (۵۱). در مطالعه‌ای، مغز استخوان موش‌های دارای نقص در NLRP3، ASC، یا IL-1 $\alpha/\beta$  به موش‌های دارای نقص برای گیرنده‌ی LDL ترنسفکت شد و به دنبال آن، موش‌ها در معرض رژیم غذایی غنی از کلسترول قرار گرفتند. این موش‌ها به شکل چشمگیری در اندازه‌ی آسیب وارده به آئورت بهبودی نشان دادند. این قبیل مطالعات نشان دهنده‌ی اهمیت فعالیت اینفلامازوم سلول‌های میلوئیدی در ایجاد آترواسکلروسیس است (۹۱).

مطالعات دیگری نشان می‌دهد LDL اکسید شده توسط ماکروفاژها بلعیده می‌شود و می‌تواند از طریق گیرنده‌های TLR4/6، CD14 و گیرنده‌های Scavenger CD36 (۹۲) سبب فعال شدن سیگنالینگ از طریق MyD88 و تحریک شدن کیناز IRAK-4 شود (۹۳-۹۴). فعال شدن این مسیر، سبب فعال شدن B Nf $\kappa$  می‌گردد. از طرفی، این عامل رونویسی در فعال شدن پروتئین‌های درگیر در تشکیل اینفلامازوم نقش دارد. علاوه بر این، اکسیداسیون LDL وابسته به ROS است (که در ماکروفاژها تولید می‌گردد). جالب این است که LDL اکسید شده خود در تولید ROS و آسیب لیزوزومی و نیز آزادسازی ترکیبات لیزوزومی مانند کاتپسین‌ها نقش دارد. در مطالعات دیگری نشان داده شده است که کاتپسین‌ها و ROS نیز در فعال کردن اینفلامازوم NLRP3 نقش دارند (۹۵، ۵۱).

مسیر پیشنهادی فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 در آترواسکلروسیس این است که ابتدا LDL تغییر

یافته (برای مثال اکسید شده) توسط گیرنده‌های TLR یا Scavenger روی ماکروفاژها شناسایی می‌شود و باعث فعال شدن عامل رونویسی B Nf $\kappa$  و بنابراین افزایش بیان پروتئین‌های IL-1 $\beta$  و NLRP3 می‌گردد. از طرفی، این ماکروفاژها کریستال‌های کلسترول را فاگوسیتوز می‌کنند که در ادامه با تخریب لیزوزوم سبب آزادسازی پروتئین‌های لیزوزومی از جمله کاتپسین‌ها می‌شوند. کاتپسین در ترکیب با ROS سبب فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 می‌شود و به این ترتیب، برش کاسپاز ۱ و بلوغ آن صورت می‌گیرد. حال کاسپاز ۱ سبب تولید IL-1 $\beta$  بالغ می‌گردد (شکل ۳). این سایتوکاین با رهایی از سلول سبب افزایش ترکیبات اینفلامازومی در درون همان سلول و سلول‌های اطراف و به علاوه باعث پاسخ‌های التهابی می‌شود که نتیجه‌ی آن جریان سلول‌های ایمنی و پیش‌روی تشکیل پلاک‌های آترواسکلروسیس است (۹۶).

## دیابت نوع ۲

از جمله ویژگی‌های این بیماری می‌توان به مقاومت به انسولین القا شده با چاقی و از دست رفتن عملکرد سلول‌های بتا در پانکراس اشاره کرد. از ویژگی‌های دیگر، می‌توان به تجمع Islet amyloid polypeptide (IAPP) پانکراتیک اشاره کرد که توسط سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها برداشته می‌شود (۹۷-۹۸). در مطالعه‌ای نشان داده شد که تحریک سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها توسط IAPP انسانی، سبب القای کاسپاز ۱ و تولید IL-1 $\beta$  از مسیر NLRP3 می‌گردد (۹۹).

مطالعات مختلفی با استفاده از موش‌های تغییر یافته‌ی ژنتیکی که فاقد ترکیبات اینفلامازومی

در انواع CAPS دارد و این بیماران نشانه‌هایی مانند رشد بیشتر در استخوان‌های دراز و یا ایجاد منتزیت مزمن دارند (۱۰۱-۱۰۲).

موتاسیون‌هایی که سبب جهش در CAPS می‌شوند، به طور معمول در کلاسترهای ژنی اطراف NOD هستند، یعنی دمینی که سبب الیگومریزاسیون پروتئین‌های NLR می‌شود و باعث افزایش فعالیت اینفلامازوم NLRP3 و نیز افزایش ترشح  $IL-1\beta$  می‌گردد. یکی از ویژگی‌های این دمین، توانایی آن در اتصال و هیدرولیز ATP است. این توانایی برای موتاسیون‌های مرتبط با CAPS جهت القای ترشح  $IL-1\beta$  لازم است (۱۰۳، ۴۲).

اما مکانیسم احتمالی در این بیماری‌ها، این است که سیگنال‌های مهاری که به طور طبیعی سبب سرکوب عملکرد NLRP3 می‌شود در صورت موتاسیون در دمین NOD از NLRP3 برداشته می‌شود (۱۰۴). در همین راستا،  $K^+$  سیتوزولی که به طور طبیعی باعث جلوگیری از فعالیت اینفلامازوم NLRP3 می‌شود، در صورت موتاسیون در NLRP3 نمی‌تواند اثر مهاری خود را ایجاد کند. مکانیسم احتمالی دوم که سبب افزایش فعالیت اینفلامازوم NLRP3 در سلول‌های جهش یافته می‌گردد، برداشته شدن اثر سرکوبگری لوپ مهاری از روی NLRP3 است. بر همین اساس، نشان داده شده است که در سلول‌های جهش یافته برای NLRP3، LPS باکتریایی می‌تواند سبب القای فعالیت کاسپاز ۱ و تولید  $IL-1\beta$  شود (۱۰۵-۱۰۶).

### نقش اینفلامازوم در سرطان کولورکتال

نقش اینفلامازوم در فیزیوپاتولوژی سرطان پیچیده است؛ به طوری که هم می‌تواند سبب التهاب

NLRP3، Asc و کاسپاز ۱ هستند، نشان می‌دهد فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 مکانیسم کلیدی در مقاومت به انسولین است. از طرفی، غیر فعال کردن این اینفلامازوم در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، سبب کاهش اضافه وزن آن‌ها می‌شود (۹۶).

یکی از مکانیسم‌های احتمالی نقش اینفلامازوم در روند دیابت نوع ۲ به این صورت است که اینفلامازوم NLRP3 می‌تواند سیگنال‌های خطر ایجاد شده در دیابت نوع ۲ از جمله JAPP، اورات، ATP خارج سلولی، اسیدهای چرب و ROS را شناسایی کند. سپس با ASC باعث فعال شدن کاسپاز ۱ و این نیز به نوبه‌ی خود سبب تولید  $IL-1\beta$  و  $IL-18$  می‌شود. این دو سایتوکاین پیش التهابی به طور احتمالی در ایجاد مقاومت به انسولین و مرگ سلول‌های بتا پانکراس و بنابراین تکوین دیابت نقش دارند (۱۰۰).

### سندرم Cryopyrin-associated periodic

سندرم‌های FCAS (Familial cold ) syndrome (autoinflammatory MWS)، (Muckle-Wells syndrome) و NOMID (Neonatal onset multi-system inflammatory disease) شکل‌های مختلف یک بیماری است که در همه‌ی آن‌ها موتاسیون اتوزومی در ژن NLRP3 رخ می‌دهد و همه‌ی آن‌ها را به عنوان سندرم‌های CAPS (Cryopyrin-associated periodic syndromes) می‌نامند. FCAS کمترین شدت را در CAPS دارد و با تب Cold-induced fever و خارش همراه کهیر شناخته می‌شود. MWS شدت بیشتری دارد و این بیماران به طور معمول مرکز عصب شنوایی از دست رفته و آرتریتیس دارند. NOMID بیشترین شدت را



در پیش‌روی توموروزن‌نشان داده شده است. احتمال می‌رود این دو در مراحل ابتدایی تشکیل تومور نقش مهمی دارند. NLRC4 از طریق آپوپتوز وابسته به p53 سبب جلوگیری از توموروزن‌سیس می‌شود (۱۱۳). از طرفی، احتمال می‌رود اینفلامازوم NLRP6 در توموروزن‌نشان نقش دارد؛ به طوری که موش‌های دارای نقص برای این پروتئین، به طور چشم‌گیری در ایجاد تومور نسبت به نمونه‌ی شاهد پیشرفت داشتند (۱۱۴).

### نقرص

نقرص یک آرتریس التهابی است که با رسوب منوسدیم اورات (MSU یا Monosodium urate) در مفاصل همراه می‌باشد و سبب التهاب می‌گردد. اگر چه نقش MSU در نقرص از دهه‌های پیش مشخص شده بود، اما مکانیسمی که کریستال‌های MSU ایجاد التهاب حاد می‌شوند، مشخص شده است (۱۱۵). بدون شک، سایتوکاین‌های پیش‌التهابی نقش حیاتی در هماهنگی واکنش التهابی کریستال‌های MSU دارند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد IL-1 $\beta$  به عنوان یک سایتوکاین پیش‌التهابی تنظیمی مهم، سبب افزایش جریان نوتروفیل‌ها به مایع سینوویال و مفصلی که مشخصه‌ی اصلی التهاب حاد است، می‌شود. در واقع، ویژگی پاتولوژیک نقرص جریان قابل توجه نوتروفیل به مایع سینوویال و مفصلی است، در صورتی که نوتروفیل‌ها در مفصل طبیعی وجود ندارند (۱۱۶-۱۱۷).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد فاگوسیت‌های تک هسته‌ای نقش مهمی در آغاز پاسخ به رسوب MSU بازی می‌کنند و منوسیت‌ها در معرض کریستال‌های MSU باعث ایجاد سایتوکاین‌های پیش‌التهابی به

کارسینوژنیک وابسته به اینفلامازوم شود و هم در فرایند حذف پیش‌سازهای بدخیم از طریق مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده مؤثر باشد. فعال شدن اینفلامازوم می‌تواند سبب تحریک پاسخ‌های ایمنی بر ضد سلول‌های توموری گردد (۱۰۷). با استفاده از آزوکسیمتان (AOM یا Azoxymethane) در بافت کلونی، نقش اینفلامازوم در تومورزایی سرطان کولورکتال نشان داده شده است (۱۰۸). مطالعات روی مدل‌های موشی نشان می‌دهد عدم اینترلوکین‌های مرتبط با اینفلامازوم مانند IL-18 می‌تواند در کارسینوژن‌ز و پیش‌روی تومور نقش داشته باشد. در واقع، فعال شدن اینفلامازوم‌های NLRP3 و NLRP6 باعث کاهش بیان پروتئین مهارکننده‌ی IL-22 (IL-22 bp) از طریق IL-18 می‌شود و به عبارت دیگر، افزایش بیان IL-22 اتفاق می‌افتد. در واقع، محور IL-22-IL-22 bp در تنظیم ترمیم بافت روده‌ای و توموروزن‌کلون نقش حیاتی دارد (۱۱۰-۱۰۹).

در مطالعات مدل‌های موشی AOM-DSS نقص در NLRP3 سبب التهاب و تومور بیشتری نسبت به نمونه‌ی شاهد می‌شود. در واقع، احتمال می‌رود IL-18 فعال شده توسط اینفلامازوم، با حفاظت کلون در برابر توموروزن ارتباط دارند (۱۱۱). از طرفی، با استفاده از IL-18 نوترکیب، نشان داده شده است که می‌تواند از طریق مسیر احتمالی IFN- $\gamma$  و مسیر سیگنالینگ ضد توموری آن، که با فعال شدن STAT1 (Signal transducer and activator of transcription) همراه است، سبب جلوگیری از تومور گردد (۱۱۲).

عدم تأثیر اینفلامازوم NLRC4 و نیز کاسپازا نیز

NLRP3 نقش دارد. TLRهای فعال شده توسط MSU سبب فعال شدن عامل رونویسی BNFk می‌شود و این عامل، رونویسی از ژن  $\beta$ -IL-1 pro را افزایش می‌دهد. حال کاسپاز ۱ سبب فعال و بالغ شدن  $\beta$ -IL-1 می‌گردد. این سایتوکاین می‌تواند به مایع مفصلی خارج سلول آزاد شود و توسط گیرنده‌های IL-1 سلول‌های اندوتلیال و ماکروفاژها شناسایی گردد و در نتیجه باعث ترشح سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های پیش التهابی از این سلول‌ها شود (۱۱۵).

#### بیماری‌های دیگر مرتبط با اینفلامازوم‌ها

NLRP1 با ASC، کاسپاز ۱ و کاسپاز ۵ ترکیب می‌شود و مشابه اینفلامازوم NLRP3 است. نتیجه‌ی عملکرد آن در فعال کردن کاسپاز ۱ ترشح  $\beta$ -IL-1 می‌باشد. Vitiligo یک اختلال Depigmenting در پوست است و در آن ملانوسیت‌ها از دست می‌روند و به طور معمول، با بیماری‌های خودایمنی مانند آرتریت روماتوئید یا لوپوس اریتروماتوز و یا بیماری Addison همراه است. یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی Vitiligo نقص در ژن‌های کنترل کننده‌ی NLRP1 است (۱۲۰). NOD2 یکی دیگر از اعضای خانواده‌ی NLR است و به طور معمول، نقص در آن در ایجاد بیماری‌های Crohn و سندرم Blau دیده می‌شود (۱۲۱). NLRP12 نوع دیگری از NLR است که به عنوان تنظیم کننده‌ی منفی فعالیت NFk B است و جهش در آن با سندرم Guadeloupe variant periodic fever در ارتباط است. موتاسیون در NLRP12 سبب از دست رفتن عمل آن و در نتیجه، کاهش عمل واسطه‌گری آن در مهار سیگنالینگ NFk B می‌شود (۱۲۲).

ویژه  $\beta$ -IL-1 می‌شوند. به عبارت دیگر، این کریستال‌ها نقش سیگنال‌های خطر را همانند پاتوژن‌های میکروبی بازی می‌کنند (۱۱۸). اولین بار Martinon و همکاران ثابت کردند که اینفلامازوم NLRP3 رسوب MSU را شناسایی و به دنبال آن پاسخ‌های ایمنی ذاتی را فعال می‌کند. ماکروفاژهای موش‌های دارای نقص در اجزای اینفلامازومی کاسپاز ۱، ASC و NLRP3 قادر به فعال کردن  $\beta$ -IL-1 در پاسخ به تحریک با رسوب MSU نمی‌باشند و از طرفی در جریان نوتروفیل‌ها نیز دارای مشکل می‌شوند (۴۹). همچنین ماکروفاژهای جدا شده از موش‌های  $\text{TLR}2^{-/-}$  و  $\text{TLR}4^{-/-}$  در دریافت کریستال‌های MSU نقص نشان می‌دهند و در تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی نیز کاهش نشان می‌دهند.

این یافته‌ها نشان می‌دهد TLRها برای التهاب القا شده با کریستال MSU ضروری است. در واقع، در فاز ابتدایی کریستال‌های MSU رسوب کرده در فضای خارج سلولی مفاصل، می‌توانند توسط TLR منوسیت‌ها شناسایی شوند و سبب رونویسی  $\beta$ -IL-1 pro می‌گردند. کریستال‌های MSU همچنین توسط منوسیت‌ها فاگوسیتوز می‌شوند (۱۱۹).

می‌توان نقش اینفلامازوم را در نقرص این گونه شرح داد: ابتدا کریستال‌های MSU توسط TLR یا فاگوسیتوز ماکروفاژها شناسایی و بلعده می‌شوند. کریستال‌های وارد شده توسط اینفلامازوم NLRP3 شناسایی می‌شوند و سپس الیگومریزاسیون NLRP3 و به دنبال آن فعال شدن کاسپاز ۱ صورت می‌گیرد. همچنین مشخص شده است که کاتپسین B، ROS و جریان  $K^+$  نیز در فعال شدن و الیگومریزاسیون



### کاربردهای درمانی

مهار فعالیت‌های اینفلامازوم NLRP3 ممکن است در جلوگیری از آسیب‌هایی که باعث پاسخ التهابی در بیماری‌های کلیوی، قلبی و ایسکمی مغزی می‌شود، اثرات مفیدی داشته باشد. به علاوه، نکروز القا شده توسط التهاب در تروما و عفونت‌های ثانویه ممکن است توسط مهار کننده‌های مسیر NLRP3 مفید باشد. در آزمایش‌هایی نشان داده شده است که استفاده از آنتاگونیست IL-1R یعنی Anakinra می‌تواند سبب کاهش در تعدادی از این بیماری‌ها شود. همچنین ویژگی‌های ادجوانتی اینفلامازوم NLRP3 می‌تواند در افزایش ایمونژنیسه مواد شیمی درمانی به کار رود. تکوین آنتاگونیست‌های اینفلامازوم NLRP3 و بهبود درک ما از مکانیسم‌های اختصاصی فعال شدن آن‌ها در کیفیت آگونیست‌های درمانی جدید مفید خواهد بود (۱۲۵-۱۲۳).

مهار کننده‌های IL-1 $\beta$  مانند IL-1Ra (Anakinra)، IL-1TRAP (Riloncept) نو ترکیب یا آنتی‌بادی IL-1 $\beta$  (Canakinumab) برای چند حالت خودالتهابی IL-1 $\beta$  به خصوص در بیماری CAPS مهم است (۱۲۸-۱۲۶). بر مبنای برهم کنش IL-1Ra با IL-1RI پپتیدهای کوچک آنتاگونیستی ۱۰۱/۱ برای بیماری التهابی دستگاه گوارش به طور موفقیت آمیزی استفاده شده است. کاسپاز ۱ نیز یکی دیگر از هدف‌های مستقیم درمان بیماری‌های التهابی است (۱۲۸).

استفاده از کلشی‌سین که یک مهار کننده میکروتوبولی است، برای درمان نقرص یا بیماری FMF (Familial Mediterranean fever) به کار می‌رود و نه تنها باعث مهار مهاجرت نوتروفیل‌ها و

تولید آن می‌شود، بلکه باعث سرکوب فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها می‌گردد (۱۲۹). از سال ۲۰۰۹ دوز پایین کلشی‌سین را به عنوان داروی مؤثر در درمان نقرص تأیید نمود (۱۳۰). یکی از اولین داروهای اختصاصی NLRP3، Glyburide است که برای دیابت نوع ۲ به کار می‌رود. این دارو سبب مهار کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم می‌شود و به این طریق، فعال شدن اینفلامازوم NLRP3 را نیز مهار می‌کند (۱۳۱).

### نتیجه‌گیری

از شناخت نقش سیستم ایمنی ذاتی و اهمیت آن در دفاع از میزبان زمان به نسبت زیادی می‌گذرد. اما به تازگی این اهمیت با شناخت NLRها و اینفلامازوم‌های مختلف و نقش آن‌ها در بیماری‌های مختلف چشمگیرتر شده است. نقش کلیدی اینفلامازوم در جهت تولید و ترشح سایتوکاین‌های التهاب‌زای کلیدی همانند IL-1 $\beta$  و IL-18 از سلول‌ها می‌باشد. مطالعه‌ی اینفلامازوم‌ها و نقش مرکزی IL-1 $\beta$  در التهاب، می‌تواند مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌زایی بیماری‌های التهابی و ویروسی و همین‌طور فعالیت آدجوانتی واکسن‌ها را تبیین نماید. به این ترتیب، شناخت مکانیسم‌های سلولی-مولکولی نقش انواع اینفلامازوم‌ها، فرصت‌های جدیدی در جهت تکوین راهکارهای نوین پیشگیری و درمانی در بیماری‌ها را در دسترس قرار می‌دهد؛ به طوری که موادی از قبیل Anakinra و مشتقاتش که اینفلامازوم‌ها را هدف قرار می‌دهند، چشم‌اندازی جدید در درمان بیماران مبتلا به خود التهابی فراهم نموده است.

## References

1. Khare S, Luc N, Dorfleutner A, Stehlik C. Inflammasomes and their activation. *Crit Rev Immunol* 2010; 30(5): 463-87.
2. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1: 1-13.
3. Mankan AK, Kubarenko A, Hornung V. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: inflammasomes: mechanisms of activation. *Clin Exp Immunol* 2012; 167(3): 369-81.
4. Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van BP. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(Suppl 1): 4607-14.
5. Franchi L, Nunez G. Immunology. Orchestrating inflammasomes. *Science* 2012; 337(6100): 1299-300.
6. Abdul-Sater AA, Said-Sadier N, Ojcius DM, Yilmaz O, Kelly KA. Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drugs Today (Barc)* 2009; 45(Suppl B): 105-12.
7. Haghparast A, Heidari KM, Malvandi AM. Down-regulation of CD14 transcripts in human glioblastoma cell line U87 MG. *Iran J Immunol* 2011; 8(2): 111-9.
8. Suzuki S, Franchi L, He Y, Munoz-Planillo R, Mimuro H, Suzuki T, et al. Shigella type III secretion protein MxiI is recognized by Naip2 to induce Nlr4 inflammasome activation independently of Pkcdelta. *PLoS Pathog* 2014; 10(2): e1003926.
9. Baccala R, Gonzalez-Quintal R, Lawson BR, Stern ME, Kono DH, Beutler B, et al. Sensors of the innate immune system: their mode of action. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5(8): 448-56.
10. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 2009; 10(3): 266-72.
11. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009; 458(7237): 509-13.
12. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(2): 95-104.
13. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 2008; 132(5): 818-31.
14. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 2008; 28(3): 285-7.
15. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458(7237): 514-8.
16. Jin T, Perry A, Jiang J, Smith P, Curry JA, Unterholzner L, et al. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* 2012; 36(4): 561-71.
17. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 2011; 187(2): 613-7.
18. Bauernfeind F, Hornung V. Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med* 2013; 5(6): 814-26.
19. Yuan S, Yu X, Topf M, Ludtke SJ, Wang X, Akey CW. Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex. *Structure* 2010; 18(5): 571-83.
20. Yuan S, Yu X, Topf M, Dorstyn L, Kumar S, Ludtke SJ, et al. Structure of the Drosophila apoptosome at 6.9 Å resolution. *Structure* 2011; 19(1): 128-40.
21. Shirasu K. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu Rev Plant Biol* 2009; 60: 139-64.
22. Ting JP, Duncan JA, Lei Y. How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science* 2010; 327(5963): 286-90.
23. Kadota Y, Shirasu K, Guerois R. NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends Biochem Sci* 2010; 35(4): 199-207.
24. Mayor A, Martinon F, De ST, Petrilli V, Tschopp J. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* 2007; 8(5): 497-503.
25. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010; 11(2): 136-40.
26. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; 469(7329): 221-5.

27. Inohara N, Koseki T, del PL, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274(21): 14560-7.
28. Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005; 73(12): 7967-76.
29. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52(11): 1591-7.
30. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124(4): 993-1000.
31. Barnich N, Aguirre JE, Reinecker HC, Xavier R, Podolsky DK. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* 2005; 170(1): 21-6.
32. Hasegawa M, Yang K, Hashimoto M, Park JH, Kim YG, Fujimoto Y, et al. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J Biol Chem* 2006; 281(39): 29054-63.
33. Shaw PJ, Lamkanfi M, Kanneganti TD. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol* 2010; 40(3): 624-7.
34. Asoodeh A, Haghparast A, Kashef R, Chamani J. Pro-Inflammatory Cytokine Responses of A549 Epithelial Cells to Antimicrobial Peptide Brevinin-2R. *Int J Pept Res Ther* 2013; 19(2): 157-62.
35. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; 10(2): 417-26.
36. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(Database issue): D229-D232.
37. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(11): 5857-64.
38. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* 2007; 25(5): 713-24.
39. Gorfou G, Cirelli KM, Melo MB, Mayer-Barber K, Crown D, Koller BH, et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *MBio* 2014; 5(1).
40. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 2006; 38(2): 240-4.
41. Newman ZL, Leppla SH, Moayeri M. CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. *Infect Immun* 2009; 77(10): 4327-36.
42. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; 20(3): 319-25.
43. Rathinam VA, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* 2012; 150(3): 606-19.
44. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009; 30(4): 556-65.
45. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 2009; 459(7245): 433-6.
46. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440(7081): 228-32.
47. Harder J, Franchi L, Munoz-Planillo R, Park JH, Reimer T, Nunez G. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol* 2009; 183(9): 5823-9.
48. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 404-10.
49. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440(7081): 237-41.
50. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 2008; 9(8): 857-65.

51. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464(7293): 1357-61.
52. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008; 320(5876): 674-7.
53. Cassel SL, Sutterwala FS. Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* 2010; 40(3): 607-11.
54. Franchi L, Munoz-Planillo R, Reimer T, Eigenbrod T, Nunez G. Inflammasomes as microbial sensors. *Eur J Immunol* 2010; 40(3): 611-5.
55. Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, Angerer RC, et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 2006; 314(5801): 941-52.
56. Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(48): 20388-93.
57. Compan V, Baroja-Mazo A, Lopez-Castejon G, Gomez AI, Martinez CM, Angosto D, et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 2012; 37(3): 487-500.
58. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009; 15(10): 1170-8.
59. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* 2009; 206(1): 79-87.
60. Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 2006; 281(48): 36560-8.
61. Ghaemi-Bafghi M, Haghparast A. Viral evasion and subversion mechanisms of the host immune system. *Zahedan J Res Med Sci* 2013; 15(10): 1-6.
62. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 2009; 5(5): 487-97.
63. Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* 2009; 4(8): e6510.
64. Shio MT, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare MJ, Harder KW, et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog* 2009; 5(8): e1000559.
65. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008; 9(8): 847-56.
66. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, et al. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat Med* 2013; 19(7): 909-15.
67. Grenier JM, Wang L, Manji GA, Huang WJ, Al-Garawi A, Kelly R, et al. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett* 2002; 530(1-3): 73-8.
68. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 2011; 145(5): 745-57.
69. Wang L, Manji GA, Grenier JM, Al-Garawi A, Merriam S, Lora JM, et al. PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. *J Biol Chem* 2002; 277(33): 29874-80.
70. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004; 430(6996): 213-8.
71. Poyet JL, Srinivasula SM, Thani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 2001; 276(30): 28309-13.
72. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(7): 3076-80.
73. Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Bircle cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol* 2006; 7(3): 318-25.
74. Damm A, Lautz K, Kufer TA. Roles of

- NLRP10 in innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 2013; 15(6-7): 516-23.
75. Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Kinoshita T, Kondo C, Konaka K, et al. PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1. *Int Immunol* 2004; 16(6): 777-86.
  76. Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti HE, Anders HJ. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int Immunol* 2010; 22(9): 717-28.
  77. Krishnaswamy JK, Chu T, Eisenbarth SC. Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. *Trends Immunol* 2013; 34(5): 224-33.
  78. Eisenbarth SC, Williams A, Colegio OR, Meng H, Strowig T, Rongvaux A, et al. NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. *Nature* 2012; 484(7395): 510-3.
  79. Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 2009; 323(5917): 1057-60.
  80. Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 2006; 443(7114): 998-1002.
  81. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 395-402.
  82. Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, et al. Listeria monocytogenes is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 2010; 40(6): 1545-51.
  83. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 385-93.
  84. Ge J, Gong YN, Xu Y, Shao F. Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a *Legionella* effector functioning in membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(16): 6193-8.
  85. Liu L, Chan C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2014; 15: 6-15.
  86. Frackowiak J, Wisniewski HM, Wegiel J, Merz GS, Iqbal K, Wang KC. Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol* 1992; 84(3): 225-33.
  87. Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, et al. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 2006; 51(6): 703-14.
  88. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801): 233-41.
  89. Wright SD, Burton C, Hernandez M, Hassing H, Montenegro J, Mundt S, et al. Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis. *J Exp Med* 2000; 191(8): 1437-42.
  90. Goldstein JL, Brown MS. Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism, and atherosclerosis. *Arch Pathol* 1975; 99(4): 181-4.
  91. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 2010; 5(7): e11765.
  92. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010; 11(2): 155-61.
  93. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008; 79(3): 360-76.
  94. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000; 105(8): 1049-56.
  95. Napoli C, de NF, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem* 2001; 82(4): 674-82.
  96. De ND, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol* 2011; 32(8): 373-9.
  97. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444(7121): 840-6.
  98. de Koning EJ, van den Brand JJ, Mott VL, Charge SB, Hansen BC, Bodkin NL, et al. Macrophages and pancreatic islet amyloidosis. *Amyloid* 1998; 5(4): 247-54.
  99. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 2010; 11(10): 897-904.



- 100.** Dixit VD. Nlrp3 inflammasome activation in type 2 diabetes: is it clinically relevant? *Diabetes* 2013; 62(1): 22-4.
- 101.** Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, Berquin P, Certain S, Cortis E, et al. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet* 2002; 71(1): 198-203.
- 102.** Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 2001; 29(3): 301-5.
- 103.** Dowds TA, Masumoto J, Zhu L, Inohara N, Nunez G. Cryopyrin-induced interleukin 1beta secretion in monocyte cells: enhanced activity of disease-associated mutants and requirement for ASC. *J Biol Chem* 2004; 279(21): 21924-8.
- 104.** Brydges SD, Mueller JL, McGeough MD, Pena CA, Misaghi A, Gandhi C, et al. Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity. *Immunity* 2009; 30(6): 875-87.
- 105.** Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W. A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity* 2009; 30(6): 860-74.
- 106.** Ozkurede VU, Franchi L. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Immunol* 2012; 167(3): 382-90.
- 107.** Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol* 2012; 13(4): 343-51.
- 108.** Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2003; 94(11): 965-73.
- 109.** Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 2012; 491(7423): 259-63.
- 110.** Nunes T, de Souza HS. Inflammasome in intestinal inflammation and cancer. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 654963.
- 111.** Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* 2010; 207(8): 1625-36.
- 112.** Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol* 2010; 185(8): 4912-20.
- 113.** Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(50): 21635-40.
- 114.** Normand S, Delanoye-Crespin A, Bressenot A, Huot L, Grandjean T, Peyrin-Biroulet L, et al. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(23): 9601-6.
- 115.** Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res* 2011; 4: 39-49.
- 116.** Yagnik DR, Hillyer P, Marshall D, Smythe CD, Krausz T, Haskard DO, et al. Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages. Implications for the control of joint inflammation in gout. *Arthritis Rheum* 2000; 43(8): 1779-89.
- 117.** Landis RC, Yagnik DR, Florey O, Philippidis P, Emons V, Mason JC, et al. Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages. *Arthritis Rheum* 2002; 46(11): 3026-33.
- 118.** Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425(6957): 516-21.
- 119.** Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R. Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 2005; 52(9): 2936-46.
- 120.** Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med* 2007; 356(12): 1216-25.
- 121.** Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 229-65.
- 122.** Jeru I, Duquesnoy P, Fernandes-Alnemri T, Cochet E, Yu JW, Lackmy-Port-Lis M, et al. Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(5): 1614-9.
- 123.** Banwell V, Sena ES, Macleod MR. Systematic review and stratified meta-analysis

- of the efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2009; 18(4): 269-76.
- 124.** Wanderer AA. Rationale for IL-1beta targeted therapy for ischemia-reperfusion induced pulmonary and other complications in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31(8): 537-8.
- 125.** Tabatabaeizadeh SE, Haghparast A. Improving the effectiveness of adjuvants: targeting innate immune receptors with a special focus on toll-like receptor agonists. *J Isfahan Med Sch* 2013; 30(214): 1986-2009. [In Persian].
- 126.** Hoffman HM. Therapy of autoinflammatory syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(6): 1129-38.
- 127.** Hawkins PN, Lachmann HJ, McDermott MF. Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(25): 2583-4.
- 128.** Quiniou C, Sapiha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, et al. Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol* 2008; 180(10): 6977-87.
- 129.** Molad Y. Update on colchicine and its mechanism of action. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4(3): 252-6.
- 130.** Crittenden DB, Pillinger MH. New therapies for gout. *Annu Rev Med* 2013; 64: 325-37.
- 131.** Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 2009; 187(1): 61-70.

## Inflammasomes and Their Role in Diseases

Amin Tavassoli MSc<sup>1</sup>, Alireza Haghparast DVM, PhD<sup>2</sup>

### Review Article

#### Abstract

Inflammasomes are cytosolic receptors which can detect microbial pathogens and endogenous danger signals resulting from stress or cell damages. Inflammasome complexes are either formed in cytosol by NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptor (NLRs) family or the absent in melanoma 2 (Aim2) protein, a member of PYHIN (pyrin and HIN domain-containing protein) family. Inflammasome activation leads to the activation of caspase 1, which in turns leads to the maturation of pro-inflammatory cytokines. In this review, first the structural features and biological functions of different types of inflammasomes will be discussed and then we will focus on the molecular mechanisms of inflammasomes in several diseases pathogenesis. Understanding these mechanisms will provide us with valuable information underlying disease pathogenesis as well as development of new and effective therapeutic and preventive strategies to combat these disorders.

**Keywords:** Inflammasomes, NLRP3, Atherosclerosis, Gout

**Citation:** Tavassoli A, Haghparast A. **Inflammasomes and Their Role in Diseases.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(304): 1668-89

1- PhD Candidate, Department of Biotechnology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Assistant Professor, Department of Immunology and Biotechnology, School of Veterinary Medicine AND Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

**Corresponding Author:** Alireza Haghparast DVM, PhD, Email: haghparast@um.ac.ir



## بررسی میزان فراوانی استافیلوکوکوس‌های اورئوس جدا شده از سواب بینی کودکان مهدهای کودک اصفهان

دکتر حمید رحیمی<sup>۱</sup>، دکتر مژگان لقمانی<sup>۲</sup>، پریسا شعاعی<sup>۳</sup>، رامین دیباج<sup>۴</sup>، دکتر بهروز عطایی<sup>۵</sup>،  
عباس داعی ناصر<sup>۳</sup>، دکتر حسن شجاعی<sup>۶</sup>

### مقاله کوتاه

### چکیده

**مقدمه:** کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک عامل خطر مهم در انتقال و به دنبال آن ایجاد عفونت توسط این باکتری به شمار می‌رود. از سوی دیگر، بینی به عنوان مهم‌ترین جایگاه بدن از لحاظ کلونیزاسیون با این باکتری می‌باشد. میزان ناقلین بینی با استافیلوکوکوس اورئوس در مکان‌هایی که افراد در تماس نزدیک با هم قرار دارند مانند مهدهای کودک بیشتر است. در این مطالعه بر آن شدیم تا میزان کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های سواب بینی گرفته شده از کودکان مهدهای کودک شهر اصفهان را تعیین نماییم.

**روش‌ها:** این مطالعه به صورت یک مطالعه مقطعی در سطح مهدهای کودک شهر اصفهان بین کودکان ۶-۲ ساله در سال ۱۳۸۷ به انجام رسید. اطلاعات اجتماعی و دموگرافیک کودکان مورد مطالعه توسط پژوهشگر و از والدین کودکان جمع‌آوری شدند. از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی نیز برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از سواب‌های بینی گرفته شده از کودکان مورد مطالعه مورد استفاده شد. در نهایت، از آزمون  $\chi^2$  برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد.

**یافته‌ها:** از ۳۳۳ نمونه سواب بینی جمع‌آوری شده از کودکان، ۱۱۵ (۳۵/۶ درصد) نفر با استافیلوکوکوس اورئوس کلونیزه شده بودند. همچنین، میانگین سن کودکان استافیلوکوکوس اورئوس منفی ( $1/0 \pm 5/7$  سال) به طور معنی‌داری بالاتر از کودکان استافیلوکوکوس اورئوس مثبت ( $8/0 \pm 5/0$  سال) بود ( $P < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** کلونیزاسیون بیش از یک سوم کودکان مورد مطالعه نشان دهنده‌ی آلودگی بالای کودکان ایرانی با استافیلوکوکوس اورئوس است که با دیگر مطالعات انجام گرفته در سایر کشورها قابل مقایسه می‌باشد. این شیوع بالا به عنوان یک هشدار، لزوم طراحی و انجام مطالعات دقیق‌تر در ارتباط با تعیین نوع و بررسی نحوه‌ی انتقال باکتری در بین کودکان را بیش از پیش آشکار می‌سازد.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، ناقلین بینی، کودک

**ارجاع:** رحیمی حمید، لقمانی مژگان، شعاعی پریسا، دیباج رامین، عطایی بهروز، داعی ناصر عباس، شجاعی حسن. **بررسی میزان فراوانی**

**استافیلوکوکوس‌های اورئوس جدا شده از سواب بینی کودکان مهدهای کودک اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲

(۳۰۴): ۱۶۹۷-۱۶۹۰

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

۲- گروه کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۶- استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است که مهم ترین گونه در جنس استافیلوکوک از نظر پزشکی به شمار می رود (۱). استافیلوکوکوس اورئوس طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل عفونت‌های پوستی مانند فولیکولیت تا بیماری‌های تهدید کننده ی زندگی مانند استئومیلیت و سپسیس را ایجاد می‌کند. علاوه بر این، استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل توکسین زا بودن می تواند نقاط بسیار دورتر از محل کولونیزه شدن را مورد تهاجم قرار دهد و باعث ایجاد بیماری گردد. غالب این توکسین‌ها به حرارت مقاوم هستند و حتی با از بین رفتن باکتری مولد، همچنان قادر به تولید بیماری می‌باشند. ایجاد بیماری‌های بسیار متنوع در انسان و همچنین قدرت بالای این پاتوژن برای کسب مقاومت دارویی، حاکی از توانایی بسیار بالای این باکتری برای تطابق و بقا در طبیعت می‌باشد (۲-۱). استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند به عنوان فلور موقت یا دایمی در بدن انسان کولونیزه گردد (۳-۴، ۱). مهم ترین قسمتی از بدن انسان که می‌تواند توسط باکتری کولونیزه گردد، منخرین جلویی بینی می‌باشد. علاوه بر آن، چین‌های پوستی در ناحیه‌ی کشاله‌ی ران، پرینه، زیر بغل و واژن نیز از جمله مناطقی از بدن انسان هستند که توسط این باکتری کولونیزه می‌شوند (۱). به طور کلی، مطالعات نشان می‌دهد که کلونیزاسیون افراد توسط استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک عامل خطر مهم در انتقال و به دنبال آن ایجاد عفونت به شمار می‌رود (۵-۶). در این میان، اهمیت کلونیزاسیون بینی از آن جهت است که مطالعات نشان می‌دهد ریشه‌کنی باکتری از ناحیه‌ی بینی باعث حذف آن از

دیگر نقاط بدن نیز می‌شود (۷-۸).

میزان ناقلین بینی در مورد این باکتری در محیط بیمارستان و جامعه، می‌تواند از ۴۰-۱۰ درصد باشد. ناقلین مزمن بینی، همواره جمعیت‌هایی مانند بیماران دارای دامل‌های راجعه، بیماران تحت عملیات‌های پزشکی مانند همودیالیز مزمن و بیماران تحت عمل جراحی را در معرض خطر قرار می‌دهند و می‌توانند باعث انتقال عفونت به افراد مستعد شوند (۹-۱۰، ۷). کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر در مکان‌های بسته مانند مهدهای کودک و سربازخانه‌ها که افراد در تماس نزدیک به هم قرار دارند، بیشتر است (۱۱-۱۰).

از سوی دیگر، مطالعات نشان می‌دهد میزان کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس در بچه‌ها نسبت به بالغین بیشتر است و همزیستی با بچه‌ها باعث افزایش کلونیزاسیون آن در بالغین می‌شود و به طور غیر مستقیم، باعث گردش باکتری در سطح جامعه و بیمارستان می‌گردد (۱۱-۱۰).

با توجه به اهمیت نقش کودکان و مهدهای کودک در انتقال استافیلوکوکوس اورئوس و عدم انجام مطالعه‌ای در این زمینه در سطح شهر اصفهان، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین میزان فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در بینی بچه‌های مهدهای کودک شهر اصفهان و نیز بررسی رابطه‌ی بین کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس و عواملی مانند سن و جنس انجام شد.

## روش‌ها

این مطالعه به صورت یک مطالعه‌ی مقطعی در سطح شهر اصفهان در سال ۱۳۸۷ به انجام رسید. روش

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) به انجام رسید و آزمون آماری  $\chi^2$  جهت مقایسه‌ی بین داده‌های کیفی مورد استفاده قرار گرفت.

### یافته‌ها

#### ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مورد

##### بررسی

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۳۲۳ کودک مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی این کودکان  $5/3 \pm 1/0$  سال بود. دامنه‌ی سنی کودکان مورد بررسی در این مطالعه، ۲-۶ سال بود که در سه گروه زیر ۵ سال، ۵ سال و ۶ سال گروه‌بندی شدند. اطلاعات مربوط به گروه‌بندی افراد، جنس و مدت زمان حضور در مهد کودک در جدول ۱ آمده است. میانگین تعداد افراد هر خانواده،  $3/6 \pm 0/7$  نفر بود؛ بدین معنی که ۱۶۰ کودک (۴۹/۵ درصد) در خانواده‌های ۳ نفره، ۱۳۶ نفر (۴۲/۱ درصد) در خانواده‌های ۴ نفره و ۲۷ نفر (۸/۴ درصد) در خانواده‌های ۵ نفره و یا بیشتر زندگی می‌کردند.

#### میزان فراوانی کلونیزاسیون استافیلوکوکوس

##### اورئوس در بینی کودکان

از ۳۲۳ کودک، تعداد ۱۱۵ نفر (۳۵/۶ درصد) در بینی با استافیلوکوکوس اورئوس کلونیزه شده بودند. جدول ۱ میزان فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس را بر حسب جنس، گروه سنی، مدت زمان حضور در مهد کودک و ارتباط شغلی والدین نشان می‌دهد. بر اساس این جدول، از لحاظ توزیع فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب گروه سنی، بیشترین میزان آلودگی در بچه‌های ۵ ساله با ۵۵ نفر

نمونه‌گیری خوشه‌ای دو مرحله‌ای برای جمع‌آوری نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ۱۵ مهد کودک از نقاط مختلف اصفهان انتخاب و از هر کدام، ۲۴ کودک از بین کودکان ۲-۶ ساله به صورت تصادفی به نسبت مساوی بین دختر و پسر برای این مطالعه انتخاب شدند. والدین کودکان به طور داوطلبانه و با رضایت‌نامه‌ی کتبی در این مطالعه شرکت کردند. همچنین این تحقیق مورد تأیید کمیته‌ی اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان قرار گرفت.

اطلاعات مربوط به ویژگی‌هایی مانند سن، جنس، تعداد افراد خانواده، مدت زمان حضور در مهد کودک و شغل والدین کودکان مورد مطالعه توسط پژوهشگر و از والدین کودکان جمع‌آوری شد.

از هر کودک، دو نمونه سواب بینی از منخرین جلویی بینی جمع‌آوری و در محیط Blood agar کشت داده شد و برای جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های مرسوم میکروبی‌شناسی، به مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال یافت.

برای جداسازی اولیه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های سواب بینی، ابتدا از محیط نوترینت آگار (Nutrient agar) استفاده شد. کلنی‌های مشکوک به استافیلوکوکوس با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین هویت ایزوله‌هایی که دارای آرایش خوشه‌ای در لام گرم بودند، از آزمایش‌های کاتالاز، حساسیت به فورازولیدون، لیزواستافین، آزمایش کلمپینگ فاکتور (Clumping factor) و کوآگولاز در لوله، آزمایش DNase و آزمایش تخمیر مانیتول استفاده شد (۱).

(۴۷/۸ درصد) مشاهده شد.

## ویژگی‌های میکروبی‌شناسی استافیلوکوکوس

### اورئوس جدا شده از بینی کودکان

۱۱۵ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس از بینی کودکان تحت بررسی جداسازی و بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی، ویژگی‌های فنوتیپیک و خصوصیات رشد تعیین هویت شدند. تمامی ایزوله‌های شناسایی شده‌ی استافیلوکوکوس اورئوس، دارای آرایش خوشه در لام گرم (مثبت)، کاتالاز مثبت، حساس به دیسک ۱۰۰ µg فورازولیدون، هاله‌ی عدم رشد ۱۰-۱۶ mm با استفاده از دیسک ۱۰ µg لیزوستافین، واکنش مثبت در آزمایش‌های کلمپینگ فاکتور (Clumping factor) و کواگولاز لوله ای، واکنش مثبت در آزمایش DNase و دارای قدرت تخمیر مانیتول بودند.

همچنین، ۳۰ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس کواگولاز منفی و ۱۲ ایزوله‌ی سودوموناس اثرورینوزا از ۳۲۳ کودک جداسازی و بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند که از مطالعه حذف گردیدند.

میانگین سنی کودکان کلونیزه شده و غیر کلونیزه با استافیلوکوکوس اورئوس در بینی به ترتیب  $5/0 \pm 0/8$  سال و  $5/7 \pm 1/0$  سال بود که از لحاظ آماری، میانگین سن کودکان غیر کلونیزه به طور معنی‌داری بالاتر از کودکان کلونیزه بود ( $P < 0/001$ ).

از نظر جنسیتی، ۵۲ نفر (۳۴/۴۳ درصد) از پسران و ۶۳ نفر (۳۶/۶ درصد) از دختران با استافیلوکوکوس اورئوس کلونیزه شده بودند که از لحاظ آماری، اختلاف معنی‌داری از لحاظ جنسیتی بین افراد کلونیزه وجود نداشت ( $P = 0/680$ ) (جدول ۱).

از لحاظ میانگین بعد خانوار ( $P = 0/820$ )، ارتباط شغلی والدین ( $P = 0/630$ ) و میانگین مدت حضور در مهد کودک برای کودکان ( $P = 0/860$ ) و کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس نیز ارتباط آماری معنی‌داری بین افراد کلونیزه شده وجود نداشت (جدول ۱).

جدول ۱. توزیع فراوانی کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس در بینی کودکان مورد مطالعه

متغیر	تعداد نمونه‌های کلونیزه شده (درصد)	تعداد نمونه‌های کلونیزه نشده (درصد)	تعداد کل نمونه‌ها (درصد)
جنس	مذکر ۵۲ (۴۵/۲۱)	۹۹ (۴۷/۶۰)	۱۵۱ (۴۶/۷۴)
	مؤنث ۶۳ (۵۴/۸۰)	۱۰۹ (۵۲/۴۰)	۱۷۲ (۵۳/۲۵)
سن (سال)	۱-۵ ۲۸ (۲۴/۴۰)	۱۵ (۷/۲۰)	۴۳ (۱۳/۳۰)
	۵ ۵۵ (۴۷/۸۰)	۷۰ (۳۳/۷۰)	۱۲۵ (۳۸/۷۰)
	۶ ۳۲ (۲۷/۸۰)	۱۲۳ (۵۹/۱۰)	۱۵۵ (۴۸/۰۰)
میانگین مدت زمان حضور در مهد کودک (سال)	۱ ۷۶ (۶۶/۱۰)	۱۳۴ (۶۴/۵۰)	۲۱۰ (۶۵/۰۰)
	۲ ۲۵ (۲۱/۷۰)	۵۰ (۲۴/۰۰)	۷۵ (۲۳/۲۰)
	< ۲ ۱۴ (۱۲/۲۰)	۲۴ (۱۱/۵۰)	۳۸ (۱۱/۸۰)
ارتباط شغلی والدین	مرتبط با امور پزشکی ۱۸ (۱۵/۶۰)	۳۷ (۱۷/۷۸)	۵۵ (۱۷/۰۰)
	عدم ارتباط با امور پزشکی ۹۷ (۸۴/۳۴)	۱۷۱ (۸۲/۲۱)	۲۶۸ (۸۳/۰۰)
جمع کل	۱۱۵ (۳۵/۶۰)	۲۰۸ (۶۴/۳۹)	۳۲۳

## بحث

استافیلوکوکوس اورئوس از دیرباز به عنوان یکی از عوامل ایجاد عفونت‌های مختلف در انسان‌ها شناخته شده است. همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس نیز از عواملی است که باعث شده است که عفونت‌های استافیلوکوکی به عنوان یک چالش جهانی مطرح باشند (۳-۴، ۱).

در این مطالعه، از ۳۲۳ نمونه‌ی سواب بینی ۱۱۵ نمونه (۳۵/۶ درصد) حاوی استافیلوکوکوس اورئوس بودند که میزان بالای کلونیزاسیون با استافیلوکوکوس اورئوس در مطالعه‌ی حاضر، تأییدی بر دیگر مطالعات انجام یافته در این زمینه است که در ادامه به مواردی از آن‌ها اشاره می‌شود.

در مطالعه‌ای در گرگان میزان کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس در بچه‌های سالم ۱۲-۶ ساله در مدرسه، ۱۶/۳ درصد بود (۱۲). صدیقی و همکاران در مطالعه‌ی دیگری میزان کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های گرفته شده از بینی کودکان در یک مرکز نگهداری در همدان را ۲۹/۶ درصد گزارش نمودند (۱۳). در تحقیقی دیگر ژاپنی نژاد و همکاران در اراک، ۷۰۰ نمونه‌ی سواب بینی از دانش‌آموزان بدون علائم بیماری را از جهت کلونیزاسیون با استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند که ۲۲ درصد از آن‌ها با این باکتری کلونیزه شده بودند (۱۴).

Okwu و همکاران در مطالعه‌ی خود میزان کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس در کودکان در سن قبل از مدرسه را ۱۸/۳ درصد تعیین کردند (۱۵). نتایج مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات، کلونیزاسیون بالای کودکان را در محیط‌های بسته مانند مهدهای کودک و مدارس نشان می‌دهد؛ که در

آن اماکن، کودکان در تماس نزدیک به هم قرار دارند. آلودگی بیش از یک سوم افراد مورد مطالعه، به دلیل نقش بالای آن در انتقال باکتری به دیگران باید مورد توجه قرار بگیرد. در این مطالعه، سن کودکان حاوی استافیلوکوکوس اورئوس به طور معنی‌داری پایین‌تر از کودکان استافیلوکوکوس اورئوس منفی بود که این می‌تواند ناشی از عدم رعایت بهداشت فردی در کودکان با سن پایین‌تر به دلیل عدم آشنایی با مسایل بهداشتی باشد. در مطالعه‌ی گرگان نیز به این مسأله اشاره شده است (۱۲).

طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق رابطه‌ی معنی‌داری بین جنس و کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس وجود نداشت. در مطالعات مختلف، رابطه‌ی بین جنس و کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس همواره مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج متفاوتی در بر داشته است. در مطالعه‌ای در تایوان، میزان کلونیزاسیون افراد مؤنث به طور معنی‌داری بالاتر بود (۱۷)؛ اما در تحقیقی دیگر در لبنان، این میزان در افراد مذکر به طور معنی‌داری بالا بود (۱۸).

در مطالعات بسیاری همانند مطالعه‌ی حاضر، رابطه‌ی معنی‌داری بین کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس و جنس تأیید نشده است. از جمله می‌توان به مطالعه‌ی تیرایی و همکاران (۱۲) در گرگان و همچنین، Dey و همکاران (۱۶) در هند اشاره نمود. از لحاظ سایر عوامل مورد بررسی مانند ارتباط شغلی والدین و بعد خانوار نیز ارتباط معنی‌داری با کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس به دست نیامد. این می‌تواند بیانگر نقش مهم محیط مهد کودک نسبت به محیط منزل در انتقال این باکتری باشد. در نهایت، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که محیط مهد

به بچه‌ها به دلیل نقش غیر قابل انکار آن‌ها در انتقال باکتری به افراد دیگر و در نتیجه، گردش باکتری در سطح جامعه می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۲۸۷۱۰۰ مصوب مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله از تمامی همکاران مرکز بیماری‌های عفونی و گرمسیری مرکز تحقیقات حضرت صدیقه طاهره (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در انجام این پژوهش صمیمانه ما را یاری رساندند، سپاسگزاری می‌شود.

کودک به عنوان یک مکان مهم برای کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس به شمار می‌رود و آموزش کودکان برای رعایت بهداشت و همچنین رعایت بهداشت از سوی دست اندر کاران مهدهای کودک، می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در بین کودکان و انتقال آن به سایر افراد در جامعه داشته باشد.

مطالعه‌ی حاضر در نوع خود تنها مطالعه‌ی انجام گرفته برای بررسی کلونیزاسیون استافیلوکوکوس اورئوس در سطح مهدهای کودک در اصفهان می‌باشد. فراوانی بالای استافیلوکوکوس اورئوس در کودکان نشان دهنده‌ی اهمیت بالای رعایت بهداشت توسط مسئولین مهدهای کودک و آموزش بهداشت

### References

1. Topley WWC, Wilson SGS, Mahy BWJ. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 10<sup>th</sup> ed. London, UK: Hodder Arnold; 2005.
2. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med 1998; 339(8): 520-32.
3. Cheng IL, Kanungo S, Schwartz A, McIntyre A, Schreckenberger PC, Diaz PS. Prevalence of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus nasopharyngeal colonization in healthy children in the United States. Epidemiol Infect 2004; 132(2): 159-66.
4. Boyce JM. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus changing? JAMA 1998; 279(8): 623-4.
5. Huang YC, Chou YH, Su LH, Lien RI, Lin TY. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and its association with infection among infants hospitalized in neonatal intensive care units. Pediatrics 2006; 118(2): 469-74.
6. von EC, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. Study Group. N Engl J Med 2001; 344(1): 11-6.
7. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10(3): 505-20.
8. Miller LG, Diep BA. Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Clin Infect Dis 2008; 46(5): 752-60.
9. Graham PL, III, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of Staphylococcus aureus colonization. Ann Intern Med 2006; 144(5): 318-25.
10. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of Staphylococcus aureus nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis 2006; 193(2): 172-9.
11. Wang JT, Liao CH, Fang CT, Chie WC, Lai MS, Lauderdale TL, et al. Prevalence of and risk factors for colonization by methicillin-resistant Staphylococcus aureus among adults in community settings in Taiwan. J Clin Microbiol 2009; 47(9): 2957-63.
12. Tabbarai A, Ghaemi E, Fazeli MR, Bakhshandeh Nosrat S, Behnampour N, Basori M. Prevalence of Staphylococci aureus nasal carrier in healthy school students in Gorgan. J Gorgan Uni Med Sci 2001, 3(2): 6-11 2001; 3(2): 6-11. [In Persian].

13. Sedighi I, Moez HJ, Alikhani MY. Nasal carriage of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and their antibiotic susceptibility patterns in children attending day-care centers. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2011; 58(3): 227-34.
14. Japoni-Nejad A, Rezazadeh M, Kazemian H, Fardmousavi N, van Belkum A, Ghaznavi-Rad E. Molecular characterization of the first community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Central Iran. *Int J Infect Dis* 2013; 17(11): e949-e954.
15. Okwu M, Bamgbala S, Aborisade W. Prevalence of nasal carriage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) among healthy primary school children in Okada, Nigeria. *Journal of Natural Sciences Research* 2012; 2(4): 61-5.
16. Dey S, Rosales-Klintz S, Shouche S, Pathak JP, Pathak A. Prevalence and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in children attending anganwaris (preschools) in Ujjain, India. *BMC Res Notes* 2013; 6: 265.
17. Lo WT, Wang CC, Lin WJ, Wang SR, Teng CS, Huang CF, et al. Changes in the nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children: 2004-2009. *PLoS One* 2010; 5(12): e15791.
18. Halablab MA, Hijazi SM, Fawzi MA, Araj GF. *Staphylococcus aureus* nasal carriage rate and associated risk factors in individuals in the community. *Epidemiol Infect* 2010; 138(5): 702-6.



## A Study on Frequency of Nasal Staphylococcus Aureus Colonization in Children from Kindergartens in Isfahan City, Iran

Hamid Rahimi MD<sup>1</sup>, Mojgan Loghmani MD<sup>2</sup>, Parisa Shoaee MSc<sup>3</sup>, Ramin Dibaj MSc<sup>4</sup>, Behrouz Ataei MD<sup>5</sup>, Abbas Daei-Naser<sup>3</sup>, Hasan Shojaei PhD<sup>6</sup>

### Short Communication

#### Abstract

**Background:** Colonization of Staphylococcus aureus causes a significantly greater risk for transmission and development of subsequent infections. The nose appears to be the most important site for this colonization. Colonization of Staphylococcus aureus is more prevalent in places where people are in close contact, such as kindergartens. In current study, we evaluated the frequency of colonization of Staphylococcus aureus in nasal swab samples taken from children in kindergartens of Isfahan city, Iran.

**Methods:** In this across-sectional study carried out in 2009, children aged 2-6 years were included. The socio-demographic information was collected by the help of their parents. Staphylococcus aureus was isolated and identified from nasal swabs via standard microbiologic methods. The chi-square method was used for statistical analysis.

**Findings:** Out of 323 nasal swabs taken from children, Staphylococcus aureus strains were isolated and identified from 115 (35.6%) samples. In addition, the median age of Staphylococcus aureus negative children ( $5.7 \pm 1.0$  years) was higher than the positive ones ( $5.0 \pm 0.8$  years) ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** Our data showed that almost one third of children were colonized by the nasal Staphylococcus aureus. This indicates a high prevalence in Iranian children comparable to that of findings from other countries. The high prevalence found in this study could be alarming for more studies using more advanced techniques to assign the types and mode of transmission among children.

**Keywords:** Staphylococcus aureus, Nasal carriage, Children

**Citation:** Rahimi H, Loghmani M, Shoaee P, Dibaj R, B, Daei Naser A, et al. A Study on Frequency of Nasal Staphylococcus Aureus Colonization in Children from Kindergartens in Isfahan City, Iran. J Isfahan Med Sch 2014; 32(304): 1690-7

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

2- Department of Pediatrics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Nosocomial Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Associate Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

6- Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Hasan Shojaei PhD, Email: h\_shojaei@idrc.mui.ac.ir

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

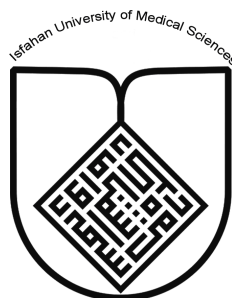
- a. **Article:** Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
  - b. **Chapter in a book:** Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations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

## INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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



## JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 32, No. 304, 1<sup>st</sup> week, December 2014

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

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

---

### Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

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

### Office:

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

Telefax: +98 311 7922291

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

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

Office Secretary: Golnaz Rajabi

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

Farzanegan Radandish Co.

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

Telefax: +98 311 6686302

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

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

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

Circulation: 500

---

### This journal is indexed in the following international indexes

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

---

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

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