

### مقاله های پژوهشی

- افزایش پوشش پروتئوم سلول های Hs578T، متعلق به سرطان پستان، در نمایه ی الکتروفورز دو بعدی با حذف کارآمد مداخله گرهای غیر پروتئینی ..... ۲۱۶  
 حمیدرضا عباسی، ندا سرای گرد افشاری، ندا محمدی، محمد مراد فرج اللهی، رضا فلک
- تشخیص استرس از سیگنال الکترومایوگرام عضلات صاف کننده ستون مهره ها ..... ۲۲۱  
 سارا پورمحمدی، علی مالکی
- مقایسه ی تأثیر دهان شویه ی کلر هگزیدین با دهان شویه ی Stop-Snoring در پیش گیری از پنومونی مرتبط با دستگاه تنهویه ی مصنوعی ... ۲۲۷  
 سید تقی هاشمی، بابک علی کیایی، محمد علی فلاح مدواری، فاطمه کریمی، ابوالفضل فلاح مدواری
- امکان شناسایی آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به روش Enzyme-Linked Aptamer Assay و مقایسه ی آن با روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ..... ۲۳۳  
 حمیدرضا میانه ساز، حسین خان احمد، مینا میریان، مریم بشتام، سید نظام الدین حسینی
- miR-135b به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی در بیماران مبتلا به اندومتریوز ..... ۲۴۱  
 سید مهدی کلانتر، نورالدین کریمی، صادق زارعی، سید حمیدرضا میرابوطالبی، فاطمه منتظری، امیرعبدیان اصل، مهرداد طالی اندواری

### Original Articles

- Improving Proteome Coverage for Hs578T Breast Cancer Cell-Line due to Efficient Interfering Removal ... 220  
 Hamidreza Abbasi, Neda Saraygord-Afshari, Neda Mohammadi, Mohammad Morad Farajollahi, Reza Falak
- Stress Detection using Electromyogram Signal of Erector Spinae Muscles ..... 226  
 Sara Pourmohammadi, Ali Maleki
- Comparison of Effects of Chlorhexidine Mouthwash versus Stop-Snoring Mouthwash in Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia ..... 232  
 Sayed Taghi Hashemi, Babak Alikiaii, Mohammad Ali Fallah-Medvari, Fatemeh Karimi, Abolfazl Fallah-Medvari
- Using Enzyme-Linked Aptamer Assay to Detect Hepatitis B Surface Antigen in Comparison to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ..... 240  
 Hamidreza Mianesaz, Hossein Khanahmad, Mina Mirian, Maryam Boshtam, Seyed Nezamoddin Hoseini
- miR-135b as a Diagnostic Biomarker in Patients with Endometriosis ..... 245  
 Seyed Mehdi Kalantar, Noorodin Karami, Sadegh Zarei, Seyed Hamidreza Mirabutalebi, Fatemeh Montazeri, Amir Abdian-Asl, Mehrdad Talebi-Andavari



# مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و ششم، شماره (۴۷۱)، هفته سوم اردیبهشت ماه ۱۳۹۷

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر مریم راد احمدی

ناشر:

انتشارات وسنا (فرزادگان راندیش)  
Email: farapublications@gmail.com  
http://farapub.com

تلفن: ۰۳۱-۳۲۲۲۴۳۳۵

دورنگار: ۰۳۱-۳۲۲۲۴۳۸۲

تیراژ: ۵۰۰ نسخه

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

Email: publications@mui.ac.ir

دفتر مجله: دانشکده پزشکی      صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶

مدیر اجرایی: علی مرادی      مسؤول دفتر: گلناز رجبی

دورنگار: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۹۱      تلفن: ۰۳۱-۳۶۶۹۴۷۳۷

Email: jims@med.mui.ac.ir

http://jims.mui.ac.ir

وب سایت مجله:

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 محمد رضا اخلاقی	دانشیار، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دکتر علی اخوان	استادیار، متخصص پرتودرمانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دکتر ابراهیم اسفندیاری	استاد، دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دکتر فرامرز اسماعیل بیگی	استاد، فوق تخصص غدد، بیمارستان‌های دانشگاهی مرکز پزشکی کیولند، آمریکا
۵- دکتر احمد اسماعیل زاده	استاد، دکترای تخصصی تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶- دکتر افسون امامی نائینی	دانشیار، فوق تخصص نفرولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۷- دکتر شاهین امامی	گروه بیوشیمی، بیمارستان سن آنتونیو، پاریس، فرانسه
۸- دکتر بابک امرا	استاد، فوق تخصص ریه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۹- دکتر رضا امین	استاد، متخصص بیماری‌های کودکان، فوق تخصص بیماری‌های ایمونولوژی و آلرژی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۱۰- دکتر فریبا ایرجی	استاد، متخصص بیماری‌های پوست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۱- دکتر کن باست	استاد، متخصص ابتکارات درمانی، دانشگاه بریتیش کلمبیا، کانادا
۱۲- دکتر رضا باقریان سرارودی	دانشیار، دکترای تخصصی روانشناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۳- دکتر مجید برکتین	استاد، متخصص روانپزشکی، فلوشیپ نوروسایکیاتری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۴- دکتر فرزین پور فرزاد	دکترای تخصصی زیست شناسی سلولی و ژنتیک، دانشگاه اراسموس، روتردام، هلند
۱۵- دکتر مسعود پورمقدس	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۶- دکتر احمد چیت‌ساز	استاد، متخصص مغز و اعصاب، فلوشیپ بیماری‌های حرکتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۷- دکتر علی حکمت نیا	استاد، متخصص رادیولوژی، فلوشیپ رادیولوژی مغز و اعصاب و کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۸- دکتر سید مرتضی حیدری	استاد، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۹- دکتر مجید خیراللهی	دانشیار، دکترای تخصصی ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۰- دکتر بهناز خانی	دانشیار، متخصص زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۱- دکتر مریم راداحمدی	استادیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۲- دکتر حسن رزمجو	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۳- دکتر رضا روزبهانی	استادیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۴- دکتر مسعود سهیلیان	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲۵- دکتر محمدرضا شریفی	استاد، دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۶- دکتر منصور شعله‌ور	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۷- دکتر رسول صالحی	استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۸- دکتر مسیح صبوری	استاد، متخصص جراحی مغز و اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۹- دکتر محمدرضا صفوی	دانشیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۰- دکتر خسرو عادل	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۳۱- دکتر سعید عندلیب جورتانی	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لوئیس ویل، آمریکا
۳۲- دکتر زیبا فرج‌زادگان	استاد، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۳- دکتر رویا کلیشادی	استاد، متخصص بیماری‌های کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۴- دکتر جعفر گلشاهی	دانشیار، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۵- دکتر عزیر گهري	استاد، متخصص جراحی پلاستیک، دانشگاه بریتیش کلمبیا، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	استاد، متخصص آسیب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس‌زاده	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	استاد، دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر عطیه مغیثی	دانشیار، فوق تخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات دیابت و غدد داخلی مارینا، آمریکا
۴۰- دکتر مرجان منصوریان	استادیار، دکترای تخصصی اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۱- دکتر محمدرضا نوربخش	استاد، متخصص فیزیوتراپی، دانشگاه جورجیای شمالی، آمریکا
۴۲- دکتر مصطفی هاشمی	دانشیار، متخصص گوش و حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران



## راهنمای نگارش و ارسال مقاله علمی - پژوهشی

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

هیأت تحریریه پس از دریافت مقالات اقدام به بررسی مقاله از لحاظ ساختاری و موضوعی می‌نماید و چنانچه مقاله در بررسی اولیه مورد تأیید باشد، برای داوری ارسال می‌شود. زمان فرایند داوری (از دریافت تا پذیرش یا رد نهایی آن) ۳ ماه و در صورت تقاضا جهت بررسی سریع‌تر با شرایط ذکر شده در راهنمای نویسندگان ۲۱ روز کاری (بجز روزهای تعطیل) می‌باشد. لازم به ذکر است داوری و انتشار مقاله در این هفته نامه مستلزم پرداخت هزینه است. لذا پس از انجام مراحل داوری و پذیرش مقاله و قبل از صدور نامه پذیرش، لازم است نویسندگان محترم فرایند مالی را تکمیل نمایند.

### نحوه ارسال دست نوشته‌ها در سامانه

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

### توجه به نکات زیر در ارسال مقاله ضروری است:

- ارسال مقاله منحصراً از طریق ثبت نام در سامانه الکترونیک مجله دانشکده پزشکی انجام می‌شود. لازم است فقط نویسنده مسئول اقدام به سابمیت مقاله نماید و مقالاتی که توسط سایر نویسندگان یا اشخاص دیگر سابمیت شوند مورد بررسی قرار نخواهند گرفت.

- نویسنده‌ای که برای بار دوم اقدام به ارسال مقاله اصلاح شده خود می‌نماید، حتماً باید از طریق صفحه شخصی قبلی خود اقدام نموده و به هیچ عنوان دوباره به عنوان کاربر جدید و با ایمیل جدید در سامانه ثبت نام نکند.

- وارد کردن اسامی تمامی نویسندگان در سامانه و در محل مربوط به وارد کردن اسامی نویسندگان مقاله، الزامی است.

- پس از ارسال مقاله، تغییر اسامی نویسندگان امکان‌پذیر نمی‌باشد.

- فایل‌هایی که نویسنده در مرحله اولیه ارسال می‌کند شامل: (۱) فایل Word دست نوشته (۲) فایل Word صفحه عنوان (۳) فرم تعهدنامه، (۴) فرم مشخصات کامل نویسندگان (Cover letter) است که به ترتیب بایستی آپلود گردند.

نکته: درج شماره تماس ضروری (تلفن همراه، تلفن ثابت و ایمیل) نویسنده مسئول در فایل مشخصات نویسندگان الزامی است.

- نویسندگان در قسمت ارسال فایل‌ها، با ارسال یک فایل تعهد نامه که به امضای همه نویسندگان رسیده است، حق انتشار مقاله را به مجله دانشکده پزشکی اصفهان واگذار می‌نمایند. در غیر این صورت مقاله در روند داوری قرار نخواهد گرفت.

- مقالات ارسالی باید دارای فایل مجزا (Cover letter) شامل یک نامه خطاب به سردبیر حاوی عنوان مقاله، اسم، آدرس و ایمیل نویسنده مسئول، اسامی و ایمیل سایر نویسندگان باشد. در این نامه بایستی به صراحت اعلام گردد که دست نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد.

- در مرحله دوم بعد از این که دست نوشته در ابتدا از نظر همراستایی با اهداف و تنظیم در چهار چوب مجله مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت و تأییدیه دفتر مجله در خصوص قابل ارجاع بودن آن دست نوشته برای شروع فرایند داوری ارسال گردید، ضروری است ۵۰ درصد کل هزینه به منظور شروع فرآیند بررسی به عنوان

(Processing fee) بر اساس موارد ذکر شده در بخش هزینه انتشار راهنمای نویسندگان پرداخت گردد. این هزینه غیر قابل برگشت می‌باشد. سپس فایل

مربوط به تصویر اسکن شده فیش پرداختی فقط با نام نویسنده مسئول (همراه با درج شماره مقاله و نوع هزینه (هزینه بررسی یا هزینه پذیرش) از طریق سایت به دفتر مجله ارسال گردد. لازم به ذکر است تنظیم دست نوشته بر اساس فرمت مجله، و پرداخت وجه اولیه فقط جهت ارسال به داوران بوده و دال بر پذیرش آن نمی‌باشد.

باشد.

## نحوه ارایه مقاله

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

- ارسال مقاله فقط از طریق سایت پذیرفته می‌شود.
- زبان رسمی مجله، فارسی است و مقالات فقط به زبان فارسی همراه با چکیده انگلیسی قابل پذیرش هستند.
- دست نوشته‌های به زبان‌های غیر از فارسی و ترجمه شده در این مجله منتشر نمی‌شود.
- مقالات باید پژوهشی و حاصل تحقیق نویسنده یا نویسندگان در زمینه علوم پزشکی (پایه و بالینی) و رشته‌های مرتبط بوده که پیش از این به انگلیسی یا فارسی در سایر مجلات منتشر نشده باشد و یا به طور همزمان به مجلات دیگر نیز ارسال نگردیده باشد.
- این مجله مقالات شامل انواع اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را در منتشر می‌نماید.
- فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین نیز توسط این مجله انتشار می‌یابد.
- مقالات قابل انتشار در مجله علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی اصفهان شامل موارد زیر می‌باشند.

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

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

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

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

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

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

تبصره ۱- مقالات ترجمه پذیرفته نمی‌شود.

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

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

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

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

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

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

صفحه عنوان: این صفحه باید شامل عنوان کامل، عنوان مکرری، اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان و همچنین آدرس، تلفن، فاکس و پست الکترونیکی نویسنده مسؤول و تقدیر و تشکر (شامل تشکر از افراد، شماره طرح پژوهشی و یا پایان نامه، ذکر منابع مالی و اعتباری طرح پژوهشی) باشد. ضروری است که علاوه بر ذکر تقدیر و تشکر در صفحه عنوان، در پایان دست نوشته نیز بخش تقدیر و تشکر مجدد تکرار گردد.

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

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

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

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

- مقدمه و معرفی: در این بخش اهداف و علل انجام مطالعه آورده می‌شود؛ بنابراین نیازی به ارائه گسترده مطالب موجود در متون علمی نیست. در این بخش باید از ارائه اطلاعات، یافته‌های و نتایج مطالعه خودداری گردد.

- روش‌ها: این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط منع آن ذکر گردد اما اگر روشی نوین است، باید به صورتی توضیح داده شود که برای سایر محققان قابل درک و به طور عینی قابل انجام و تکرار باشد. در صورت استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص باید نام، نام کارخانه سازنده و آدرس آن در پرانتز ذکر گردد. اگر از دارو در مطالعه استفاده شده است باید نام ژنریک، دوز و روش مصرف آن آورده شود. در مورد افراد و بیماران تحت مطالعه باید جنس و سن (همراه انحراف معیار) آورده شود. در مورد نرم‌افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد.

در صورتی که مطالعه دارای پرسش‌نامه یا چک لیست است، ضمیمه کردن آن لازم است؛ شیوه تأمین روایی مشخص شود و توصیف دقیق فرآیند اجرایی برای رواسازی آن توضیح داده شود. چگونگی تعیین روش‌های مورد استفاده برای تأمین پایایی پرسش‌نامه و گزارش نتایج آزمون‌های آماری به کار گرفته شده جهت تأمین پایایی توضیح داده شود. در مورد پرسش‌نامه‌های استاندارد ذکر نام و مرجع آن کافی است.

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

- بحث: در این بخش در ابتدا به یافته‌های مهم اساسی مطالعه و سپس تشابه و تفاوت‌های آن با یافته‌های سایر پژوهشگران در مطالعات مشابه اشاره می‌گردد. ذکر جزئیات کامل یافته‌ها در این بخش لازم نیست. تأکید بر یافته‌های جدید و با اهمیت مطالعه حاضر و دستاوردهای آن در این قسمت ضروری است. ذکر این که فرضیه ارائه شده در مطالعه صحیح یا نادرست بوده، یا این که دلایل کافی برای رد یا قبول آن به دست نیامده است، ضروری می‌باشد. هدف این بخش، ذکر دلیل اصلی انجام تحقیق، تحلیل و تفسیر یافته‌ها و همچنین نتیجه‌گیری کلی (Conclusion) است.

- جدول‌ها: جداول بدون حاشیه خارجی ارسال گردد. تعداد محدود جدول با توجه به حجم مطالعه و مقاله، همراه با ذکر عنوان آن در بالای جدول مورد قبول خواهد بود. ارسال جداول فقط تحت نرم‌افزار MSWord مورد قبول است. توضیحات اضافی در خصوص محتوای جداول باید به صورت پی‌نوشته و در پایین جدول باشد. جدول‌ها باید در صفحات جداگانه و در پایان دست‌نوشته (پس از منابع) قرار داده شوند. جدول‌ها باید دارای زمینه سفید و بدون سایه و ترام باشد. جداول باید توسط نرم‌افزار MS Word و فاقد هرگونه صفحه آرای، فاصله خطوط ۱ برابر (Single)، قلم B Zar و سایز ۱۰ و قلم متغیرهای هر ستون B Zar و سایز ۱۰ Bold تهیه شوند. برای تایپ کلمات لاتین در جدول از قلم Time New Roman سایز ۹ استفاده شود.

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

تبصره ۱- اگر شکل یا جدولی از مرجع دیگری اخذ شده است، شماره مرجع در آخر عنوان جدول یا شکل نوشته شود و مشخصات مأخذ در بخش مراجع درج شود. -تقدیر و تشکر: در این بخش تمام افرادی که به نحوی در انجام مطالعه نقش داشته ولی جزء نویسندگان نبوده‌اند مورد تقدیر قرار گیرند؛ از جمله کسانی که کمک‌های فنی، نوشتاری و مالی داده و همچنین سرپرستان و مدیران بخش‌های محل انجام مطالعه که در امر پشتیبانی‌های عمومی در اجرای تحقیق فعالیت داشته‌اند. همچنین ذکر نام سازمان(های) حمایت‌کننده یا تأمین‌کننده مالی پژوهش در این بخش ضروری است.

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

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

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

-اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

نمونه انگلیسی:

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

نمونه فارسی:

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

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

- اگر منبع مورد نظر کتاب است:

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

نمونه انگلیسی:

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

نمونه فارسی:

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

- اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

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

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

- منابع به صورت پایان نامه

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

- منابع به صورت الکترونیکی - مجله الکترونیکی روی اینترنت

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

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

منابع به صورت صفحه وب

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

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

- نمونه خوانی (**Proofreading**): یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده مسؤل

ارسال می گردد که لازم است در کوتاه ترین زمان تغییرات مورد نظر مجله انجام داده، از طریق وبسایت مجله ارسال نماید.

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

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

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

- ملاحظات اخلاقی: این ملاحظات باید در بخش روش ها اشاره گردند. اخذ رضایت نامه از کلیه ی افراد بالغ شرکت کننده در مطالعه ضروری است و در مورد کودکان و افراد تحت تکفل باید از ولی قانونی آنها اخذ شود. ذکر منبع تأیید کننده ی ملاحظات اخلاقی مطالعه لازم است. هنگام استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ذکر رعایت و مقررات استاندارد مربوط لازم است.

- تداخل منافع (Conflict of Interest): نویسنده یا نویسندگان باید هر گونه ارتباط مالی مانند دریافت هزینه، حق الزحمه، مواد و تجهیزات از دانشگاه ها، سازمان ها، نهادها، شرکت ها و سایر منابع که انتشار یافته های مطالعه می تواند به آنها سود یا زیان برساند را اعلام نمایند.





## فهرست مطالب

### مقاله‌های پژوهشی

- افزایش پوشش پروتئوم سلول‌های Hs578T، متعلق به سرطان پستان، در نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی با حذف کارآمد  
مداخله‌گرهای غیر پروتئینی ..... ۲۱۶  
حمیدرضا عباسی، ندا سرای‌گرد افشاری، ندا محمدی، محمد مراد فرج‌اللهی، رضا فلک
- تشخیص استرس از سیگنال الکترومایوگرام عضلات صاف‌کننده ستون مهره‌ها ..... ۲۲۱  
سارا پورمحمدی، علی مالکی
- مقایسه‌ی تأثیر دهان‌شویه‌ی کلرهگزیدین با دهان‌شویه‌ی Stop-Snoring در پیش‌گیری از پنومونی مرتبط با دستگاه تنهویه‌ی مصنوعی.... ۲۲۷  
سیدتی هاشمی، بابک علی‌کیایی، محمدعلی فلاح‌مدواری، فاطمه کریمی، ابوالفضل فلاح‌مدواری
- امکان شناسایی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به روش Enzyme-Linked Aptamer Assay و مقایسه‌ی  
آن با روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ..... ۲۳۳  
حمیدرضا میانه‌ساز، حسین خان‌احمد، مینا میریان، مریم بشتام، سید نظام‌الدین حسینی
- miR-135b به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی در بیماران مبتلا به اندومتريوز ..... ۲۴۱  
سید مهدی کلانتر، نورالدین کرمی، صادق زارعی، سید حمیدرضا میرابوطالبی، فاطمه منتظری، امیر عبدیان اصل، مهرداد طالبی اندواری

## افزایش پوشش پروتئوم سلول‌های Hs578T، متعلق به سرطان پستان، در نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی با حذف کارآمد مداخله‌گرهای غیر پروتئینی

حمیدرضا عباسی<sup>۱</sup>، ندا سرای‌گرد افشاری<sup>۲</sup>، ندا محمدی<sup>۱</sup>، محمد مراد فرج‌اللهی<sup>۳</sup>، رضا فلک<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** با وجود استفاده‌ی گسترده، پوشش پروتئینی پایین و الگوهای اسمیری، از مهم‌ترین موانع بازدارنده برای استفاده از مطالعات پروتئومیک مبتنی بر ژل در بررسی‌های بالینی می‌باشد. بنابراین، در این مطالعه تلاش شد تا پوشش نمایه‌ی دو بعدی پروتئوم رده‌ی سلولی Hs578T، متعلق به سرطان پستان افزایش یابد و تأثیر کارآمدی روش‌های مرسوم حذف مداخله‌گرهای غیر پروتئینی در افزایش تعداد پروتئین‌ها در نمایه‌ی دو بعدی ارزیابی گردد.

**روش‌ها:** سلول‌های رده‌ی Hs578T، به منظور استخراج عصاره‌ی خام سلولی، در بافر لیز مناسب تیمار شدند. عصاره‌های سلولی حاصل از استخراج‌های متعدد، با هم همگن و در حجم‌های یکسان تقسیم شدند و در سه تکرار، با روش‌های استون، استون-متانول و تری‌کلرواستیک اسید (TCA یا Trichloroacetic acid) - استون خالص گشتند. سپس، پروتئوم خالص تهیه شده از هر روش، در یک بافر بازآبرسانی استاندارد حل شد و بر روی نوارهای Immobilized pH gradient (IPG) ۱۷ سانتی‌متری بارگذاری گشت. پس از تفکیک ایزوالکتریک در بعد اول، محتوای پروتئوم، یک بار دیگر در سیستم الکتروفورز O'Farrell نیز مورد تفکیک الکتروفوریک قرار گرفت. در نهایت، پس از ظهور نقاط پروتئینی در نمایه‌ی دو بعدی، تصاویر حاصل با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster به صورت کمی - کیفی تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** بازده بازیابی پروتئوم، برای روش‌های استون، استون-متانول و TCA - استون به ترتیب  $0.100 \pm 0.001$ ،  $0.070 \pm 0.002$  و  $0.120 \pm 0.005$  نانوگرم به ازای هر سلول محاسبه شد. آنالیز تصویر نیز حضور  $9 \pm 1299$  نقطه‌ی پروتئینی را در نمایه‌ی دو بعدی تخلیص شده با استون نشان داد که این تعداد برای تخلیص با استون-متانول و TCA - استون به ترتیب  $14 \pm 1698$  و  $17 \pm 1973$  بود. نتایج از سه اندازه‌گیری جداگانه به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** آماده‌سازی نمونه‌ها با روش TCA - استون، نه تنها بالاترین بازده بازیابی پروتئین را دارد؛ بلکه، پوشش پروتئومی بهتری را نیز ارائه می‌دهد. بنابراین، این روش برای مطالعات پروتئومیک مقایسه‌ای توصیه می‌گردد. با این وجود، تخلیص با استون-متانول، با توجه به ارابه‌ی نقاط پروتئینی قوی‌تر، برای مطالعات سرولوژیکی پروتئوم پیشنهاد می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** پروتئین، تخلیص، الکتروفورز دو بعدی، رده‌ی سلولی، سرطان پستان

**ارجاع:** عباسی حمیدرضا، سرای‌گرد افشاری ندا، محمدی ندا، فرج‌اللهی محمد مراد، فلک رضا. افزایش پوشش پروتئوم سلول‌های Hs578T، متعلق به سرطان پستان، در نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی با حذف کارآمد مداخله‌گرهای غیر پروتئینی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۱): ۲۲۰-۲۱۶

بعدی، که از ابزارهای اصلی پروتئومیک مقایسه‌ای می‌باشد، در ارتقای کیفیت مطالعات دارویی، بررسی تغییرات بیان پروتئین‌ها، به‌ویژه در بافت‌ها و سلول‌های سرطانی که حاوی اطلاعات زیستی فراوانی هستند، اهمیت بیشتری می‌یابد (۱-۲). الکتروفورز دو بعدی، روشی است که در آن پروتئین‌ها در دو بعد، بر اساس بار الکتریکی و سپس

### مقدمه

پروتئومیک مقایسه‌ای مبتنی بر ژل ابزاری کارآمد جهت بررسی محتوای پروتئوم است که می‌تواند ایجاد، حذف، افزایش یا کاهش بیان مجموعه‌های پروتئینی را مورد بررسی و مقایسه قرار دهد. از این رو، افزایش تعداد پروتئین‌های قابل مشاهده در الگوی الکتروفورز دو

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

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

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

این سلول‌ها مطابق با دستورالعمل مرکز و استانداردهای پذیرفته شده، در محیط کشت *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Biowest، فرانسه) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) (Biowest، آلمان) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Atocel، اتریش) درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند (۱۲). جهت استخراج پروتئوم تام، به ازای ۳۰ میلیون سلول، ۱ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (حاوی ۴۰ میلی‌مولار تریس، ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، ۴ درصد CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)، ۴۰ میلی‌مولار دی‌تیوتریتول و ۲ درصد آمفولیت (Bio-Rad، هرکولس، کالیفرنیا) اضافه شد. سپس، عصاره با دور  $\times g$  ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی حاوی پروتئین و سایر ترکیبات زیستی، در سه میکروتیوب تقسیم و با استفاده از یکی از سه روش رسوب‌گیری استون، استون - متانول و TCA - استون مطابق، با دستورالعمل زیر خالص‌سازی شدند (۱۳).

**تخلیص پروتئین با استفاده از رسوب‌گیری استون:** به هر حجم از نمونه، چهار حجم استون سرد شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد اضافه شد. مخلوط نمونه و رسوب دهنده برای مدت یک ساعت در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شد. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شتاب  $\times g$  ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی تخلیه و رسوب حاصل با یک حجم استون سرد شستشو داده شد. جداسازی محتوای پروتئینی از مخلوط با استفاده از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شتاب  $\times g$  ۱۳۰۰۰ انجام و با حذف مایع رویی تکمیل شد (۱۱).

**تخلیص پروتئین با رسوب‌گیری استون - متانول:** به هر حجم از نمونه، ۸ حجم از مخلوط استون - متانول (که از قبل با نسبت حجمی ۸ به ۱ تهیه شده و در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خنک شده بود)، افزوده شد. مخلوط نمونه و رسوب دهنده برای مدت یک شب در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار شد. سپس، محتوای پروتئینی با استفاده از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور  $\times g$  ۱۳۰۰۰ از مخلوط جدا شده، مایع رویی دور ریخته شد (۱۱).

**تخلیص پروتئین با رسوب‌گیری TCA - استون:** مخلوط رسوب دهنده در این روش، محلول TCA ۲۰ درصد حل شده در استون بود. این محلول از قبل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خنک شده بود. به مخلوط رسوب دهنده تا غلظت (Weight/volume یا W/V) ۰/۲ درصد Dithiothreitol (DTT) افزوده شد. هر حجم از نمونه با ۹ حجم از این محلول به خوبی مخلوط شد و یک شب در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردید. پس از گذشت این زمان،

وزن مولکولی، درون ژل‌های پلی‌آکریل آمید تفکیک می‌شوند (۳). موفقیت الکتروفورز دو بعدی تا حد زیادی به نحوه‌ی آماده‌سازی نمونه وابسته است. در واقع، شیوه‌ی صحیح استخراج و تخلیص پروتئین، حذف مواد مداخله‌گر و انتخاب صحیح ترکیب بافرهای مورد استفاده، یکی از مؤثرترین عوامل در افزایش تعداد نقاط پروتئینی و کیفیت الگوی آن‌ها در نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی است. نمونه‌هایی که با روش الکتروفورز دو بعدی مورد آنالیز و جداسازی قرار می‌گیرند، می‌بایست پروتئین‌هایی خالص و عاری از هر گونه مواد مداخله‌گر باشند (۴-۵).

از جمله مداخله‌گرهای مهم در مطالعات پروتئومیک می‌توان به اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها، نمک‌ها و پلی‌ساکاریدها اشاره نمود. این ترکیبات، باعث افزایش گران‌روی و اختلال در مسیر حرکت پروتئین‌ها، گرفتگی منافذ ژل، میان‌کنش با حامل‌های آمفولیتی و پروتئین‌ها و نیز سبب اختلال در مهاجرت الکتروفورتیک، بروز رگه‌های افقی و عمودی در الگوی نهایی و ممانعت از ورود پروتئین‌ها به بستر ژل‌های تفکیک کننده می‌شوند (۶-۷).

یکی از کارآمدترین روش‌ها برای حذف مداخله‌گرها، استفاده از شیوه‌های مختلف رسوب‌گیری پروتئین است. تاکنون چندین مطالعه در راستای بررسی اثرات روش‌های رسوب‌گیری پروتئین بر روی الگوی الکتروفورز دو بعدی بر روی نمونه‌های زیستی مختلف صورت گرفته است. نتایج این مطالعات، نشان دهنده‌ی این واقعیت هستند که کارایی روش‌های مختلف رسوب‌گیری پروتئین‌ها بسته به نوع نمونه متفاوت است و در مورد هر نمونه، می‌بایست به طور مستقل مورد بررسی قرار گیرد (۸-۱۱). بر اساس بررسی‌های انجام شده، چنین مطالعه‌ای در ارتباط با سلول‌های سرطانی بافت پستان که مطالعات پروتئومیک آن از اهمیت بالایی در تشخیص و درمان بیماری برخوردار است، گزارش نشده بود. از این رو، مطالعه‌ی حاضر به منظور افزایش کارایی مطالعات پروتئوم سرطان پستان، با هدف بررسی اثر سه روش مرسوم رسوب‌گیری پروتئین بر روی پروتئوم تام سلول‌های Hs578T در نمایه‌ی دو بعدی انجام شد.

## روش‌ها

تمامی مواد شیمیایی استفاده شده برای کشت سلول، آماده‌سازی نمونه و انجام الکتروفورز دو بعدی، به جز در موارد مشخص شده، از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. تمامی مراحل کار نیز در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزشکی، واقع در دانشکده‌ی پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران به انجام رسید.

**کشت سلول و استخراج پروتئین:** رده‌ی سلولی Hs578T از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. جهت تکثیر

## یافته‌ها

بررسی‌های انجام شده نشان داد که بازده بازیابی پروتئین تام، برای روش‌های استون، استون-متانول و TCA- استون به ترتیب  $0/001 \pm 0/100$ ،  $0/002 \pm 0/070$  و  $0/005 \pm 0/120$  نانوگرم به ازای هر سلول می‌باشد. به این ترتیب، رسوب‌گیری با TCA- استون بالاترین بازده بازیابی را بین این سه روش به خود اختصاص می‌دهد. این نتیجه، می‌تواند به معنای این باشد که در عین حال که روش توانسته است سهم پروتئین‌های بازی در رسوب پروتئینی را افزایش دهد (ماهیت اسیدی TCA سبب نهشت بیشتر پروتئین‌های بازی در رسوب گردد)، سهمی از پروتئین‌های اسیدی نمونه‌های Hs578T که می‌توانند به دلیل تمایل به محیط اسیدی TCA بعد از رسوب‌گیری از نمونه حذف گردند نیز کوچک بوده و همین عامل، باعث افزایش تعداد لکه‌های پروتئینی در نمایه‌ی مربوط شده است.

نمایه‌ی دو بعدی پروتئوم تخلیص شده‌ی سلول‌های Hs578T، که به سه روش مختلف تیمار شدند، در شکل ۱ قابل مشاهده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تخلیص پروتئین با روش رسوب‌گیری TCA- استون در حذف کشیدگی‌های عمودی و افقی موفق‌تر بوده است. محتوای اسیدی این رسوب دهنده، نقش مؤثری در حذف چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک که عاملی برای بروز کشیدگی‌های عمودی و افقی در نمایه‌های دو بعدی هستند، دارد و از دو روش دیگر مناسب‌تر می‌نماید.

نتایج مربوط به شمارش نقاط پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster (شکل ۱- پنل راست) نیز نشان دادند که تعداد نقاط پروتئینی در بستر ژل با استفاده از رسوب دهنده‌ی استون،  $9 \pm 1299$ ، با استفاده از رسوب دهنده‌ی استون-متانول،  $14 \pm 1698$  و با استفاده از رسوب دهنده‌ی TCA- استون،  $17 \pm 1973$ ، می‌باشد. بنابراین، تخلیص با TCA- استون در غنی‌سازی پروتئین‌های بازی، کارآمد می‌باشد؛ هر چند که تا حدی سبب حذف و/یا تضعیف پروتئین‌های اسیدی شده است.

## بحث

در این پژوهش، با هدف افزایش بازده تحقیقاتی پژوهش‌های مرتبط با سرطان پستان، برای نخستین بار بهینه‌سازی الگوی نمایه‌ی الکتروفورز دو بعدی سلول‌های رده‌ی Hs578T در دستور کار قرار گرفت. به این منظور، آن چنان که در بخش‌های پیشین به تفصیل شرح داده شد، تأثیر سه روش مرسوم حذف آلودگی‌های غیر پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت.

پروتئین‌های خالص شده با ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ نمونه‌ها در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور  $13000 \times g$  از مخلوط جدا و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل، به منظور حذف کامل TCA، سه بار با محلول شستشو که حاوی ۹۰ درصد حجمی استون، ۱۰ درصد حجمی آب و ۰/۰۲ درصد وزنی DTT بود، شسته شد (۱۱).

**انحلال رسوب‌های پروتئینی:** پس از رسوب‌گیری با هر یک از روش‌های پیش‌گفته، رسوب‌های پروتئینی خالص شده در مقادیر مناسبی از بافر انحلال (حاوی ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، (W/V) ۴ درصد CAHPS، ۱۰۰ میلی‌متر DTT و (V/V) ۲ درصد آمفولیت) حل و در پایان مرحله‌ی اول با استفاده از روش Bradford تعیین غلظت شدند.

**الکتروفورز دو بعدی:** پروتئوم تخلیص شده از سه روش پیش‌گفته با استفاده از سیستم الکتروفورز دو بعدی تفکیک گشت. به این منظور، در بعد اول جداسازی ۱۸۰ میکروگرم از نمونه‌های پروتئینی تا حجم نهایی ۳۰۰ میکرولیتر با بافر بازآب‌دهی (حاوی ۷ مولار اوره، ۲ مولار تیوره، ۴ درصد CHAPS، ۰/۰۰۲ درصد بروموفنول‌بلو، ۲ درصد حامل آمفولیتی ۳-۱۰ و ۱۲ میکرولیتر/میلی‌لیتر هیدروکسی‌اتیلن‌دی‌سولفید (GE Healthcare)، پپسکتاوا، نیوجرسی آمریکا) مخلوط شدند و بر روی نوارهای Immobilized pH gradient (IPG) ۱۷ سانتی‌متری با گستره‌ی pH لگاریتمی در محدوده‌ی ۳-۱۰ (Bio-Rad) هرکولس، کالیفرنیا) بارگذاری شدند و به مدت یک ساعت در دمای اتاق آنکوبه گشتند. پروتئین‌های بارگذاری شده در نوارها سپس با اعمال ولتاژ در دستگاه IEF cell (Bio-Rad) تحت تأثیر متمرکزسازی ایزوالکتریکی قرار گرفتند.

پروتئین‌های متمرکز شده در IPG فاقد بار می‌باشند. پس در دو مرحله‌ی ۲۰ دقیقه‌ای با استفاده از بافرهای مخصوص متعادل‌سازی، با سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate یا SDS) به تعادل رسیدند و بار لازم برای مهاجرت در بعد دوم را کسب کردند. در بعد دوم، نوارهای IPG به ژل‌های ۱۷ سانتی‌متری پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد منتقل شدند تا این بار پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی تحت جریان ثابت ۱۶ میلی‌آمپر برای مدت ۳۰ دقیقه و جریان ثابت ۲۴ میلی‌آمپر برای مدت ۶ ساعت از یکدیگر تفکیک شوند. به منظور رنگ‌آمیزی ژل‌ها و ظهور نقاط پروتئینی از رنگ‌آمیزی نقره نترات سازگار با طیف‌سنجی جرمی استفاده شد (۱۳).

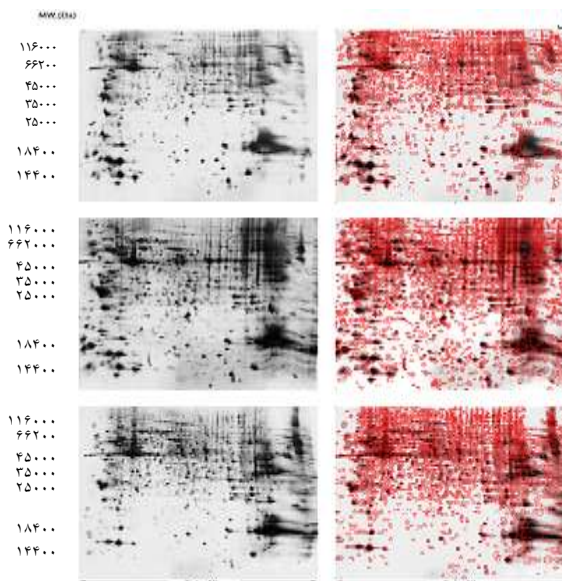
تصویر نهایی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دانسیتومتر GS-800 (Bio-Rad) و نرم‌افزار Quantity One اخذ و سپس، با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster 2D Platinum مورد تحلیل کمی - کیفی قرار گرفت.

یافته‌ها نشان دادند که تخلیص پروتئوم Hs578T با TCA- استون از نظر میزان بازیابی پروتئوم تام، حذف کشیدگی‌های عمودی و افقی و تعداد نقاط پروتئینی قابل مشاهده در نمایه‌ی دو بعدی، از سایر روش‌ها کارآمدتر است.

این روش، بیشترین میزان بازیابی پروتئین تام و نقاط پروتئینی نمایه‌ی دو بعدی را نیز دارد، اما اغلب نقاط پروتئینی دارای غلظت بسیار پایینی هستند تا جایی که تعداد قابل توجهی از آن‌ها، تنها با استفاده‌ی نرم‌افزار آنالیز تصویر قابل شناسایی می‌باشند. از این رو، می‌توان بیان کرد که در پروتئومیک مقایسه‌ای روش TCA- استون بسیار کارآمد است؛ در حالی که در روش استون- متانول، اگر چه تعداد پروتئین‌ها کمتر است، اما بیشتر نقاط قوی می‌باشند و از غلظت بالایی برخوردارند. بنابراین، چنانچه هدف، انجام آنالیز سرولوژیکی پروتئوم باشد که در آن غلظت نقاط پروتئینی اهمیت دارد، استفاده از روش استون- متانول پیشنهاد می‌گردد.

### تشریح و قدردانی

این مطالعه، بخشی از یک طرح تحقیقاتی ثبت شده در معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد ثبتی ۲۶۸۴۹-۳۱-۰۵-۹۴ می‌باشد. بدین وسیله، از آن معاونت محترم قدردانی می‌گردد.



شکل ۱. تصاویر ژل‌های دو بعدی از پروتئوم سلول‌های Hs578T، تخلیص شده با روش‌های مختلف رسوب‌گیری که با استفاده از دانسیتومتر GS-800 و نرم‌افزار Quantity one اخذ شده‌اند (پنل سمت چپ) و آنالیز آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageMaster 2D platinum (پنل سمت راست). شکل‌ها به ترتیب نمایه‌های حاصل از روش‌های رسوب‌گیری الف) استون، ب) استون- متانول و ج) TCA- استون را به نمایش می‌گذارند.

### References

1. Witzmann FA, Grant RA. Pharmacoproteomics in drug development. *Pharmacogenomics J* 2003; 3(2): 69-76.
2. Saraygord-Afshari N, Naderi-Manesh H, Naderi M. Enhanced reproducibility of the human gel-based tear proteome maps in the presence of di-(2-hydroxyethyl) disulfide. *Biotechnol Appl Biochem* 2014; 61(6): 660-7.
3. Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics* 2014; 11(1): 16.
4. Rabilloud T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol* 1999; 112: 9-19.
5. Rabilloud T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 1996; 17(5): 813-29.
6. Hao R, Adoligbe C, Jiang B, Zhao X, Gui L, Qu K, et al. An optimized trichloroacetic acid/acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of qinchuan cattle longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling. *PLoS One* 2015; 10(4): e0124723.
7. Berkelman T. Removal of interfering substances in samples prepared for two-dimensional (2-D) electrophoresis. In: Posch A, editor. *2D PAGE: Sample preparation and fractionation*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 51-62.
8. Nejadi N, Mohammadpoor Masti S, Rezaei Tavirani M, Golmohammadi T. Comparison of three routine protein precipitation methods: Acetone, TCA/acetone wash and TCA/acetone. *J Paramed Sci* 2014; 5(4): 58-60.
9. Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A* 2004; 1023(2): 317-20.
10. Fic E, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Pirog A, Dziedzicka-Wasylewska M. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis* 2010; 31(21): 3573-9.
11. Saraygord-Afshari N, Naderi-Manesh H, Naderi M. Increasing proteome coverage for gel-based human tear proteome maps: Towards a more comprehensive profiling. *Biomed Chromatogr* 2015; 29(7): 1056-67.
12. Butler M. *Animal cell culture and technology*. Abingdon, UK: Taylor and Francis; 2003.
13. Westermeier R, Naven T. *Proteomics in practice: A Laboratory manual of proteome analysis*. Hoboken, NJ: Wiley; 2002.

## Improving Proteome Coverage for Hs578T Breast Cancer Cell-Line due to Efficient Interfering Removal

Hamidreza Abbasi<sup>1</sup>, Neda Saraygord-Afshari<sup>2</sup>, Neda Mohammadi<sup>1</sup>,  
Mohammad Morad Farajollahi<sup>3</sup>, Reza Falak<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** In spite of the wide use, low proteome coverage and fuzzy patterns are the most important deterrents for the clinical applications of gel-based proteomic studies. So herein, we tried to increase the 2-dimensional proteome coverage of Hs578T breast cancer cells via investigating the efficacy of the three common techniques, usually used for interfering removal.

**Methods:** Hs578T cells were incubated in a lysis solution to obtain raw cell extracts. Cellular soups of each extraction were then pooled, homogenized, and aliquoted to be further treated by three different protein-specific purification methods including acetone, acetone-methanol, and trichloroacetic acid (TCA)-acetone, each in triplicates. All the purified protein pellets were then dissolved in a standard rehydration buffer solution, loaded into the 17-cm immobilized pH gradient (IPG) strips, and separated according to their isoelectric points. Proteins were then separated once more according to their molecular weights in an O'Farrell separation system. Finally, by the visualization of the protein spots on the 2-dimensional profiles, quality and quantity of these 2-dimensional proteome patterns were then analyzed using the ImageMaster software.

**Findings:** The obtained proteome recovery yields and total protein counts for acetone, acetone-methanol, and trichloroacetic acid-acetone methods were  $0.100 \pm 0.001$ ,  $0.070 \pm 0.002$ , and  $0.120 \pm 0.005$  ng/cell, and  $1299 \pm 9$ ,  $1698 \pm 14$  and  $1973 \pm 17$ , respectively. The results represent data obtained from three independent experiments.

**Conclusion:** Trichloroacetic acid-acetone purification not only represented the highest recovery yield, suitable for expensive assays, but also showed the most suitable proteome coverage. So, the method is recommended for the comparative proteomic studies. However, the acetone-methanol procedure is more recommended for serological proteome analysis (SERPA); since it represents stronger protein spots which are more fitted to the immunoblotting procedure.

**Keywords:** Proteome, Purification, Two-dimensional gel electrophoresis, Cell line, Breast cancer

**Citation:** Abbasi H, Saraygord-Afshari N, Mohammadi N, Farajollahi MM, Falak R. **Improving Proteome Coverage for Hs578T Breast Cancer Cell-Line due to Efficient Interfering Removal.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(471): 216-20.

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

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

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

4- Associate Professor, Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Neda Saraygord-Afshari, Email: neda.s.afshari@gmail.com



## تشنخیص استرس از سیگنال الکترومایوگرام عضلات صاف کننده ستون مهره‌ها

سارا پورمحمدی<sup>۱</sup>، علی مالکی<sup>۲</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** تشنخیص استرس به منظور کنترل، مدیریت و کاهش آن ضروری و مهم است. از طرفی، نظریه‌های متعددی درباره‌ی کمردرد ناشی از استرس وجود دارد. مهم‌ترین نکته در همه‌ی این نظریه‌ها، آن است که عوامل روانی و احساسی باعث نوعی تغییر فیزیولوژیک و در نتیجه، بروز کمردرد می‌شوند. از این رو، به نظر می‌رسد بتوان از سیگنال الکترومایوگرام (EMG یا Electromyogram) عضلات کمر به عنوان نشانگری با هدف تشنخیص استرس بهره برد.

**روش‌ها:** در این مطالعه، به تشنخیص استرس با استفاده از سیگنال الکترومایوگرام عضلات صاف کننده‌ی ستون مهره‌ها (Erector spinae muscles) پرداخته شد. ثبت سیگنال از عضلات صاف کننده‌ی ستون مهره‌های راست و چپ ۱۵ نفر انجام شد. پس از استخراج هفت ویژگی حوزه‌ی زمان و فرکانس، با استفاده از طبقه‌بند Support vector machine (SVM) به تشنخیص استرس در دو حالت دو سطحی (بدون استرس/استرس) و چهار سطحی (بدون استرس، استرس کم، استرس متوسط و استرس زیاد) پرداخته شد. همچنین، با استفاده از روش‌های انتخاب ویژگی، تلاش شد تا عملکرد روش پیشنهادی بهبود داده شود.

**یافته‌ها:** در حالت دو سطحی، استرس با صحت ۱۰۰ درصد تشنخیص داده شد. در حالت چهار سطحی نیز کارایی عضله‌ی صاف کننده‌ی ستون مهره‌های راست بالاتر بود و به صحت ۱۰۰ درصد دست یافت.

**نتیجه‌گیری:** الکترومایوگرام عضلات صاف کننده‌ی ستون مهره‌ها، نشانگر خوبی برای تشنخیص استرس می‌باشد. عضله‌ی صاف کننده‌ی ستون مهره‌های راست، مؤثرتر از عضله‌ی سمت چپ عمل کرده است. انتخاب ویژگی‌ها نیز به کاهش حجم محاسبات و بهبود کارایی در تشنخیص استرس کمک می‌کند. نتایج این مطالعه در تشنخیص استرس به منظور کنترل و مدیریت آن کاربرد دارد.

**واژگان کلیدی:** استرس روانی، تشنخیص، الکترومایوگرام، عضلات کمر، عضلات اطراف ستون مهره‌ها

**ارجاع:** پورمحمدی سارا، مالکی علی. تشنخیص استرس از سیگنال الکترومایوگرام عضلات صاف کننده ستون مهره‌ها. مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۱): ۲۲۶-۲۲۱

## مقدمه

استرس شغلی بر بهره‌وری و توانایی کار نیز توسط Kuorinka و همکاران (۵) بر روی ۶۵۳ نفر بررسی شده است.

بر اساس پرسش‌نامه‌ی شغلی، درد کمر و استرس مرتبط با شغل رابطه‌ی متقابل دارند و هر دو تأثیر مستقل و اثر هم‌افزایی احتمالی بر روی توانایی کار کردن نشان داده‌اند (۶). Kim و همکاران نیز بر ارتباط استرس شغلی در آتش‌نشانان و اختلالات اسکلتی-عضلانی تأکید کرده‌اند (۷). همچنین، Taib و همکاران به بررسی تأثیر استرس بر عضلات شانه و دست در هنگام استفاده از کامپیوتر شخصی و تلفن همراه پرداخته‌اند. عضلات مورد بررسی ذوزنقه‌ای بالایی (Upper trapezius muscle)، دلتاسان (Deltoid muscle)،

مطالعات پیشین نشان می‌دهند که بین کمردرد و عوامل روان‌شناسی شامل اضطراب، افسردگی، نارضایتی و استرس رابطه وجود دارد (۳-۱). همچنین، اختلالات اسکلتی-عضلانی ناشی از استرس در پژوهش‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. داودیان‌طلب و همکاران (۴)، در پژوهشی میزان استرس شغلی و اثر دردهای کمر و پشت بر سطح استرس را بررسی کرده‌اند. این مطالعه، بر روی ۸۹ نفر صورت گرفته است که به روش نمونه‌برداری تصادفی از کارکنان اداری انتخاب شده‌اند. نتایج تحلیل آماری، بیانگر آن است که میزان همبستگی درد کمر و سطح استرس در کارکنان اداری بالا است. اثر

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی زیست فناوری، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی زیست فناوری، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

Email: amaleki@semnan.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤو: علی مالکی

در پایان هر یک از مراحل پیش گفته، افراد با توجه به میزان استرس خود از بدون استرس تا استرس خیلی زیاد، نمره‌ای بین ۵-۱ می‌دهند. تکالیف محاسبات ریاضی مورد استفاده در این مطالعه براساس پژوهش Gjoreski و همکاران بود (۱۴) که به صورت برخط (Online) در دسترس قرار دارد (۱۵). تمام مراحل آزمون محاسبات ریاضی همراه با فشار زمانی و ارزیابی ناظر (حضور آزمایشگر و تذکر دادن) بود. در پژوهش‌های پیشین، بر تأثیر استفاده از نویز محیطی، ارزیابی ناظر و فشار زمانی در افزایش استرس افراد تأکید شده است (۱۶-۱۷، ۸).

**استخراج ویژگی:** ابتدا سیگنال‌های الکترومایوگرام با فیلتر بالاگذر باترورت (Butterworth filter) مرتبه‌ی ۴ با فرکانس قطع ۱۰ هرتز فیلتر شد. سپس، با یکسوسازی و عبور از فیلتر پایین‌گذر Butterworth مرتبه‌ی ۴ با فرکانس قطع ۶ هرتز، فعالیت عضلانی (Activation) محاسبه گردید. برای سیگنال الکترومایوگرام و فعالیت عضلانی، به ترتیب از نمادهای قراردادی E و A در روابط استفاده گردیده است. همچنین، با محاسبه‌ی مربع اندازه‌ی تبدیل فوریه‌ی سریع (Fast fourier transform یا FFT) سیگنال الکترومایوگرام، طیف توان سیگنال تعیین گردید که در روابط با نماد قراردادی P نشان داده شده است.

در این پژوهش، هفت ویژگی از سیگنال الکترومایوگرام استخراج شده است که شامل ویژگی‌های ریشه‌ی میانگین مربعات الکترومایوگرام (Root mean square electromyogram یا RMSE)، ریشه‌ی میانگین مربعات فعالیت عضلانی (RMSA)، مقدار میانگین قدر مطلق (Mean absolute value یا MAV)، انرژی (Energy) و واریانس (Variance) در حوزه‌ی زمان و ویژگی‌های فرکانس میانه (Median frequency یا MDF) و فرکانس میانگین (Mean frequency یا MNF) در حوزه‌ی فرکانس می‌باشند. ریشه‌ی میانگین مربعات سیگنال الکترومایوگرام و ریشه‌ی میانگین مربعات فعالیت عضلانی، طبق رابطه‌ی ۱ محاسبه می‌شوند.

(۱)

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N E^2}$$

$$RMSA = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A^2}$$

مقدار میانگین قدر مطلق فعالیت عضله، طبق رابطه‌ی ۲ محاسبه می‌شود.

$$MAV = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |A| \quad (2)$$

Extensor carpi ulnaris و Extensor digitorum می‌باشند. بر اساس نتایج آنان، محیط استرس‌زا بالاترین اثر را بر روی فعالیت عضله‌ی ذوزنقه‌ای دارد، اما در سه عضله‌ی دیگر، تنش ایجاد نمی‌کند. بر این اساس، انتخاب عضله‌ی مناسب که با استرس در ارتباط باشد، بسیار اهمیت دارد (۸).

نتایج حاصل از مطالعات گذشته به خوبی نشان می‌دهد که میان استرس و دردهای کمر ارتباط تنگاتنگی وجود دارد. از سوی دیگر، استفاده از سیگنال الکترومایوگرام عضله‌ی ذوزنقه‌ای در تشخیص استرس رایج می‌باشد (۹-۱۱)، اما سیگنال الکترومایوگرام عضلات صاف کننده‌ی ستون مهره‌ها تا به حال در تشخیص استرس به کار گرفته نشده‌اند. مطالعه‌ی حاضر، با هدف ارزیابی کارایی الکترومایوگرام عضلات صاف کننده‌ی کمر در تشخیص استرس انجام شد.

### روش‌ها

مراحل کار شامل ثبت سیگنال‌های الکترومایوگرام عضلات صاف کننده‌ی ستون مهره‌ها (راست و چپ)، پیش‌پردازش سیگنال‌ها، استخراج ویژگی، انتخاب ویژگی و طبقه‌بندی به منظور تشخیص استرس بود که در ادامه شرح داده می‌شود.

**مجموعه‌ی دادگان:** سیگنال‌های الکترومایوگرام سطحی از ۱۵ نفر شامل ۱۱ زن و ۴ مرد در محدوده‌ی سنی ۲۲-۴۶ سال (۷/۲ ± ۲۸/۱ سال) ثبت شد. ابتدا، روند آزمایش توسط آزمایشگر توضیح داده شد و فرم رضایت آگاهانه توسط افراد تکمیل گردید. الکتروگذار مطابق استاندارد SENIAM (۱۲) انجام شد. ثبت سیگنال الکترومایوگرام با نرخ ۱۰۰۰ نمونه در ثانیه و توسط حسگر الکترومایوگرام سطحی SX230 و دستگاه Datalog ساخت شرکت Biometrics انجام شد. شیوه‌نامه‌ی القای استرس با زمان کل ۳۷ دقیقه به ترتیب شامل مراحل زیر بود:

- ۱- استراحت اولیه برای ثبت سیگنال خط مبنا (Baseline) به مدت ۵ دقیقه
- ۲- پرکردن پرسش‌نامه‌ی مقیاس استرس درک شده (Percived stress score یا PSS) (۱۳) و انتظار به مدت ۳ دقیقه
- ۳- آزمون محاسبات ریاضی با سطح ساده به مدت ۵ دقیقه
- ۴- استراحت به مدت ۳ دقیقه
- ۵- آزمون محاسبات ریاضی با دشواری متوسط به مدت ۵ دقیقه
- ۶- استراحت به مدت ۳ دقیقه
- ۷- آزمون محاسبات ریاضی دشوار همراه با نویز محیطی به مدت ۵ دقیقه
- ۸- استراحت نهایی (مرحله‌ی بازیابی) به مدت ۸ دقیقه.



c با فرض معلوم بودن f باشد، از رابطه ی ۷ محاسبه می شود.

$$MI = \sum_{c \in C} \int p(c, f) \log \frac{p(c, f)}{p(c)p(f)} df \quad (7)$$

اگر اطلاعات متقابل بین دو متغیر مقدار بزرگی باشد، نشان دهنده ی وابسته بودن آن دو متغیر به یکدیگر خواهد بود. در نتیجه، مقدار MI بزرگ تر برای یک ویژگی نسبت به سایر ویژگی ها، رتبه ی بالاتری برای انتخاب شدن به آن ویژگی می دهد (۲۱).

**طبقه بندی:** طبقه بند ماشین بردار پشتیبان (Support vector machine یا SVM) یکی از رایج ترین طبقه بندها در تشخیص استرس است (۲۲). در این پژوهش، تابع کرنل SVM از نوع چند جمله ای می باشد. تقسیم دادگان به بخش های آموزش و آزمون به روش Leave-one-out انجام شد. برچسب دادگان نیز با استفاده از مراحل آزمایش القای استرس (عامل استرس زا) به دو صورت دو سطحی و چهار سطحی تعیین گردید. در حالت دو سطحی، برچسب های بدون استرس و استرسی مربوط به مراحل استراحت اول و آزمون دوم انتخاب شد و در حالت چهار سطحی برچسب های بدون استرس، استرس کم، استرس متوسط و استرس زیاد به ترتیب مربوط به مراحل استراحت اول، آزمون اول، آزمون دوم و آزمون سوم انتخاب شد. برای ارزیابی کارایی طبقه بند از معیار کمی صحت طبقه بندی (Classification accuracy) استفاده گردید.

### یافته ها

صحت طبقه بندی با استفاده از روش Leave-one-out برای دو حالت دو سطحی و چهار سطحی به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ ارائه شده است. به علاوه، با استفاده از روش MI، ویژگی انرژی فعالیت عضله دارای بالاترین مقدار MI بود و به عنوان ویژگی منتخب تعیین شد. ترتیب سایر ویژگی ها به صورت فرکانس میانه، ریشه ی میانگین مربعات سیگنال الکترومایوگرام، فرکانس میانگین، میانگین فعالیت عضله، ریشه ی میانگین مربعات فعالیت عضله و واریانس است. ویژگی های انتخاب شده با استفاده از روش SFS نیز انرژی فعالیت عضله، RMS سیگنال الکترومایوگرام و فرکانس میانه هستند. صحت طبقه بندی کننده برای ویژگی های منتخب و برای حالات دو و چهار سطحی نیز در جدول های ۱ و ۲ ارائه شده است.

واریانس (رابطه ی ۳) نوعی سنجش از میزان پراکندگی است که نشان می دهد داده ها حول میانگین چگونه پخش شده اند.

$$VAR = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (A - \bar{A})^2 \quad (3)$$

رابطه ی ۴، نشانگر میزان انرژی فعالیت عضلانی است (۱۸).

$$Energy = \sum_{i=1}^N (|A|^2) \quad (4)$$

فرکانس میانگین، نشانگر نسبت مجموع حاصل ضرب طیف توان الکترومایوگرام و فرکانس بر مجموع کل طیف توان است. رابطه ی ۵، این ویژگی را توصیف می کند. که در آن، f مقدار فرکانس طیف توان، P<sub>j</sub> نمونه ی ژام طیف توان و M تعداد گزینه های فرکانسی (Frequency bin) است.

$$MNF = \frac{\sum_{j=1}^M f_j P_j}{\sum_{j=1}^M P_j} \quad (5)$$

فرکانس میانه، نشانگر فرکانسی است که در آن طیف توان به دو ناحیه با مقدار توان یکسان تقسیم می شود. رابطه ی ۶، این ویژگی را توصیف می کند که در آن، P<sub>j</sub> نمونه ی ژام طیف توان سیگنال EMG در ژامین گزینه ی فرکانسی و M تعداد گزینه های فرکانسی است (۱۹).

$$\sum_{j=1}^{MDF} P_j = \sum_{j=MDF}^M P_j = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^M P_j \quad (6)$$

به منظور استخراج ویژگی، سیگنال مربوط به ۳ دقیقه ی میانی از مراحل آزمایش القای استرس انتخاب شد و ویژگی ها برای هر دوره ی ۶۰ ثانیه ای از سیگنال محاسبه گردید.

**انتخاب ویژگی:** از دو روش اطلاعات متقابل (Mutual information یا MI) و انتخاب ترتیبی جلوسو (Sequential forward selection یا SFS) برای انتخاب ویژگی استفاده شد. الگوریتم SFS یک الگوریتم انتخاب زیر مجموعه است. این الگوریتم، از یک زیر مجموعه ی تهی از ویژگی ها شروع می کند و با استفاده از یک روش تکراری، با اضافه کردن ویژگی ها به این زیر مجموعه، به بردار ویژگی بهینه دست می یابد (۲۰).

روش اطلاعات متقابل با اندازه گیری اطلاعات، ویژگی ها را رتبه بندی می کند. اطلاعات متقابل، بین یک بردار ویژگی f و رده ی c چنانچه p(c) احتمال رده های مختلف ۱، ۲، ...، Nc = ۱ و p(c, f) احتمال شرطی متغیر

جدول ۱. درصد صحت طبقه بندی برای حالت دو سطحی (بدون استرس و استرسی).

ویژگی ها	۷ ویژگی (همه ی ویژگی ها)	۳ ویژگی (منتخب روش SFS)	۱ ویژگی (منتخب روش MI)	عضله
	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	صاف کننده ی ستون مهره های راست
	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	صاف کننده ی ستون مهره های چپ
	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	هر دو

MI: Mutual information; SFS: Sequential forward selection

جدول ۲. درصد صحت طبقه‌بندی برای حالت چهار سطحی (استرس خیلی کم، استرس کم، استرس متوسط و استرس زیاد).

عضله	ویژگی‌ها	ویژگی ۷ (همه‌ی ویژگی‌ها)	ویژگی ۳ (منتخب روش SFS)	ویژگی ۱ (منتخب روش MI)
صاف کننده‌ی ستون مهره‌های راست	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۱/۶۷
صاف کننده‌ی ستون مهره‌های چپ	۶۷/۶۶	۶۷/۶۶	۸۳/۳۳	۶۶/۶۷
هر دو	۹۱/۶۷	۹۱/۶۷	۹۱/۶۷	۹۱/۶۷

MI: Mutual information; SFS: Sequential forward selection

فعالیت عضله) کافی می‌باشد. در این حالت، حتی یک طبقه‌بند ساده همچون k-nearest neighbors (KNN) نیز قادر است عملکرد مطلوبی ایجاد کند. در حالت سنجش چهار سطحی، استفاده از سه ویژگی منتخب روش SFS، عملکرد عضله‌ی صاف کننده‌ی ستون مهره‌های چپ را بهبود بخشیده است. در صورتی که حجم و پیچیدگی محاسبات مهم باشد، به طور مثال در کاربردهای عملی و بر خط، استفاده از ویژگی‌های منتخب به جای تمامی ویژگی‌ها پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی گروه مهندسی پزشکی دانشگاه سمنان می‌باشد. نویسندگان این مقاله از افرادی که با حضور در آزمایشگاه جهت ثبت سیگنال‌ها همکاری نمودند، قدردانی می‌نمایند.

### بحث

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، سیگنال الکترومایوگرام عضلات صاف کننده‌ی ستون مهره‌ها می‌تواند برای تشخیص استرس به کار رود. در شرایط تشخیص دو سطحی (استرس / بدون استرس)، صحت طبقه‌بندی ۱۰۰ درصد است. در این حالت، با هر یک از عضلات چپ و یا راست، می‌توان به بالاترین صحت دست یافت، اما در شرایط سنجش چهار سطحی (بدون استرس / استرس کم / استرس متوسط و استرس زیاد) عملکرد عضله‌ی صاف کننده‌ی ستون مهره‌های راست بهتر از عضله‌ی سمت چپ است؛ به نحوی که بالاترین صحت طبقه‌بندی برای آن ۱۰۰ درصد به دست آمد. علاوه بر آن، استفاده از روش‌های انتخاب ویژگی در شرایط دو سطحی منجر به دستیابی به صحت ۱۰۰ درصد شده است. این بدان معنا می‌باشد که برای تشخیص استرس، تنها یک ویژگی (انرژی

### References

- Larsman P, Sandsjo L, Klipstein A, Vollenbroek-Hutten M, Christensen H. Perceived work demands, felt stress, and musculoskeletal neck/shoulder symptoms among elderly female computer users. The NEW study. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96(2): 127-35.
- Kjellberg A, Wadman C. The role of the affective stress response as a mediator of the effect of psychosocial risk factors on musculoskeletal complaints; Part 1: Assembly workers. *Int J Ind Ergon* 2007; 37(4): 367-74.
- Larsman P, Thorn S, Sogaard K, Sandsjo L, Sjogaard G, Kadefors R. Work related perceived stress and muscle activity during standardized computer work among female computer users. *Work* 2009; 32(2): 189-99.
- Davoudian Talab A, Badfar G, Nikomaram M, Azari G, Mansori A. Effect of back pain on occupational stress among white-collar workers. *Journal of Health Research in community* 2017; 3(2): 35-43. [In Persian].
- Kuorinka I, Jonsson B, Kilbom A, Vinterberg H, Biering-Sorensen F, Andersson G, et al. Standardised Nordic questionnaires for the analysis of musculoskeletal symptoms. *Appl Ergon* 1987; 18(3): 233-7.
- Oberlinner C, Yong M, Nasterlack M, Pluto RP, Lang S. Combined effect of back pain and stress on work ability. *Occup Med (Lond)* 2015; 65(2): 147-53.
- Kim MG, Kim KS, Ryoo JH, Yoo SW. Relationship between occupational stress and work-related musculoskeletal disorders in Korean male firefighters. *Ann Occup Environ Med* 2013; 25(1): 9.
- Taib MF, Bahn S, Yun MH. The effect of psychosocial stress on muscle activity during computer work: Comparative study between desktop computer and mobile computing products. *Work* 2016; 54(3): 543-55.
- Pourmohammadi S, Maleki A. An automatic approach to continuous stress assessment during driving based on fuzzy c-means clustering. *Modares Journal of Electrical Engineering* 12013; 3(1): 9-17.
- Healey JA, Picard RW. Detecting stress during real-world driving tasks using physiological sensors. *IEEE Trans Intell Transp Syst* 2005; 6(2): 156-66.
- Aigrain J, Spodenkiewicz M, Dubuisson S, Detyniecki M, Cohen D, Chetouani M. Multimodal stress detection from multiple assessments. *IEEE Trans Affect Comput* 2016; 1.
- SENIAM. Recommendations for sensor locations on individual muscles [Online]. [cited 2013]; Available from: [http://seniam.org/sensor\\_location.htm](http://seniam.org/sensor_location.htm)
- Cohen S. Perceived Stress Scale. Menlo Park, CA: Mind Garden, Inc; 1994.
- Gjoreski M, Gjoreski H, Lustrek M, Gams M. Continuous stress detection using a wrist device: In laboratory and real life. *Proceedings of 2016 ACM*

- International Joint Conference on Pervasive and Ubiquitous Computing (UbiComp 2016); 2016 Sep 12-16; Heidelberg, Germany. New York, NY: ACM: p. 1185-93.
15. Jozef Stefan Institute, Department of Intelligent Systems. The-S-Test [Online]. [cited 2015]; Available from: URL: <https://dis.ijs.si/thetest/>
  16. Wijsman JLP, Grundlehner B, Penders J, Hermens HJ. Trapezius muscle EMG as predictor of mental stress. *Acm Trans Embed Comput Syst* 2013; 12(4): 99.
  17. Sarafino EP, Smith TW. Health psychology: Biopsychosocial interactions. 8<sup>th</sup> ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2013.
  18. Phinyomark A, Phukpattaranont P, Limsakul C. Feature reduction and selection for EMG signal classification. *Expert Syst Appl* 2012; 39(8): 7420-31.
  19. Oskoei MA, Hu H. Support vector machine-based classification scheme for myoelectric control applied to upper limb. *IEEE Trans Biomed Eng* 2008; 55(8): 1956-65.
  20. Schenk J, Kaiser M, Rigoll G. Selecting Features in On-Line Handwritten Whiteboard Note Recognition: SFS or SFFS? *Proceedings of 10<sup>th</sup> International Conference on Document Analysis and Recognition*; 2009 Jul 26-29; Barcelona, Spain. p. 1251-4.
  21. Kwak N, Choi CH. Input feature selection by mutual information based on Parzen window. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 2002; 24(12): 1667-71.
  22. Sharma N, Gedeon T. Objective measures, sensors and computational techniques for stress recognition and classification: a survey. *Comput Methods Programs Biomed* 2012; 108(3): 1287-301.

## Stress Detection using Electromyogram Signal of Erector Spinae Muscles

Sara Pourmohammadi<sup>1</sup>, Ali Maleki<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Stress detection is essential and important in order to control, manage, and reduce it. On the other hand, there are many theories about the stress-related back pain. The most important point in all of these theories, is the psychological and emotional factors that cause some kinds of physiological changes, and as a result, back pain. Therefore, it seems that the electromyogram (EMG) signal of the lower back muscles can be used as a marker for stress detection.

**Methods:** In this research, stress was detected using the electromyogram signal of erector spinae muscles. The signals of 15 persons were recorded from left and right erector spinae muscles. After extracting seven time and frequency domain features, stress was detected in two-level (stress and no stress) and four-level (no stress, low stress, moderate stress, and high stress) modes applying an efficient support vector machine (SVM) classifier. It was also attempted to improve the performance of the proposed approach by using feature selection methods.

**Findings:** In two-level mode, stress was detected with 100% of accuracy. In the four-level mode, the efficiency of the right erector spinae muscle was higher and reached 100% of accuracy.

**Conclusion:** The results denote that the electromyogram of the erector spinae muscles is an appropriate indicator of stress. The right erector spinae muscle is more effective than the left one. Furthermore, feature selection reduces the computation amount, and improves the efficiency of stress detection. The findings of this study can be used to detect stress for controlling and managing it.

**Keywords:** Psychological stress, Diagnosis, Electromyogram, Back muscles, Paraspinal muscles

**Citation:** Pourmohammadi S, Maleki A. **Stress Detection using Electromyogram Signal of Erector Spinae Muscles.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(471): 221-6.

1- PhD Student, Department of Biomedical Engineering, School of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran  
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, School of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran  
**Corresponding Author:** Ali Maleki, Email: amaleki@semnan.ac.ir

## مقایسه‌ی تأثیر دهان‌شویه‌ی کلرگزیدین با دهان‌شویه‌ی Stop-Snoring در پیش‌گیری از پنومونی مرتبط با دستگاه تهویه مصنوعی

سیدتقی هاشمی<sup>۱</sup>، بابک علی‌کیایی<sup>۱</sup>، محمدعلی فلاح‌مدواری<sup>۲</sup>، فاطمه کریمی<sup>۳</sup>، ابوالفضل فلاح‌مدواری<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** پنومونی مرتبط با دستگاه تهویه مکانیکی، عفونتی بسیار شایع در بخش مراقبت‌های ویژه است که با افزایش عوارض و احتمال مرگ و میر همراه است. این مطالعه، با هدف مقایسه‌ی تأثیر دهان‌شویه‌ی کلرگزیدین با دهان‌شویه‌ی گیاهی Stop-snoring در پیش‌گیری از پنومونی مرتبط با دستگاه تهویه مکانیکی در بیماران بخش مراقبت‌های ویژه انجام شد.

**روش‌ها:** ۸۶ بیمار بستری در بخش مراقبت‌های ویژه جهت شرکت در مطالعه به صورت تصادفی در دو گروه مساوی شامل استفاده از دهان‌شویه‌ی کلرگزیدین ۰/۲٪ و مراقبت و شستشوی دهان با استفاده از دهان‌شویه‌ی Stop-snoring تقسیم شدند. دفعات، زمان و شیوه‌ی دهان‌شویه در هر دو گروه روزی سه بار اجرا شد. زمان بروز و فراوانی پنومونی وابسته به دستگاه تهویه مکانیکی در این دو گروه مقایسه شد.

**یافته‌ها:** در گروه Stop-snoring، ۷۴/۴۱ درصد و در گروه کلرگزیدین ۶۲/۷۹ درصد دچار پنومونی شدند ( $P = ۰/۳۵۳$ ). همچنین، در گروه کلرگزیدین، ۲۲/۲۲ درصد قبل از روز پنجم و ۷۷/۷۷ درصد پس از روز پنجم دچار پنومونی شده‌اند و در گروه Stop-snoring، ۶/۲۵ درصد قبل از روز پنجم و ۹۳/۷۵ درصد پس از روز پنجم دچار پنومونی شدند ( $P = ۰/۱۲۶$ ).

**نتیجه‌گیری:** دهان‌شویه‌ی کلرگزیدین با دهان‌شویه‌ی Stop-snoring در پیش‌گیری از پنومونی مرتبط با دستگاه تهویه مکانیکی در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، هیچ ارجحیتی بر یکدیگر در زمان بروز و کاهش میزان بروز پنومونی ندارند.

**واژگان کلیدی:** دهان‌شویه، کلرگزیدین، پنومونی وابسته به تهویه مصنوعی

**ارجاع:** هاشمی سیدتقی، علی‌کیایی بابک، فلاح‌مدواری محمدعلی، کریمی فاطمه، ابوالفضل فلاح‌مدواری<sup>۴</sup>. مقایسه‌ی تأثیر دهان‌شویه‌ی کلرگزیدین با دهان‌شویه‌ی Stop-Snoring در پیش‌گیری از پنومونی مرتبط با دستگاه تهویه مصنوعی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۱): ۲۳۲-۲۳۷

### مقدمه

پنومونی در بخش مراقبت‌های ویژه در مطالعات مختلف ۲۰-۱۰ درصد گزارش شده است و در بیماران با تهویه مکانیکی، می‌تواند به ۸۰ درصد برسد (۵). به علاوه، پنومونی بیمارستانی، طول دوره‌ی اقامت در بیمارستان را ۹-۷ روز افزایش می‌دهد (۱). میزان بروز پنومونی ناشی از تهویه مکانیکی ۳-۱ درصد به ازای هر روز استفاده از تهویه مکانیکی است و ۸۶ درصد پنومونی بیمارستانی، در ارتباط با تهویه مکانیکی است که ۲۷ درصد بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه را مبتلا می‌کند و میزان مرگ بیشتر در ارتباط با میکروارگانسیم‌هایی نظیر *Pseudomonas aeruginosa* و گونه‌های *Acinetobacter* است (۶-۷).

پنومونی وابسته به تهویه مکانیکی، نوعی از پنومونی بیمارستانی می‌باشد که به دنبال بیش از ۴۸ ساعت از تهویه مکانیکی ایجاد می‌شود و از معمول‌ترین مشکلات می‌باشد (۱-۲). پنومونی ناشی از تهویه مکانیکی دومین عفونت بیمارستانی شایع بعد از عفونت‌های مجاری ادراری است و میزان مرگ و میر ناشی از آن نسبت به سایر پنومونی‌های بیمارستانی بیشتر و در حدود ۷۱ درصد است (۳-۴). پنومونی بیمارستانی در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه (Intensive care unit یا ICU)، شایع‌ترین عفونت بیمارستانی است که می‌تواند در ۷۰-۲۰ درصد موارد با مرگ همراه باشد. میزان بروز

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

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

نویسنده‌ی مسؤول: بابک علی‌کیایی

Email: alikiaib@yahoo.com

به عنوان یکی از توصیه‌ها جهت کاهش نرخ پنومونی ناشی از تهویه مکانیکی، مطالعات متعددی توسط پژوهشگران مختلف انجام شده است (۱۷، ۱۰، ۶).

با وجود اهمیت زیاد پیش‌گیری از پنومونی ناشی از تهویه مکانیکی در کاهش مرگ و میر، کاهش مدت زمان بستری و کاهش هزینه‌های مراقبت، در ایران پژوهش سیستماتیک و دقیقی در مورد چگونگی و میزان تأثیر مراقبت‌های دهان و دندان و به ویژه کاربرد کلرهگزیدین و Stop-snoring در کاهش نرخ پنومونی و میزان ارجحیت آن‌ها نسبت به هم انجام نگرفته است. از این رو، با توجه به اهمیت کنترل و جلوگیری از بروز پنومونی ناشی از تهویه مکانیکی در بخش مراقبت‌های ویژه و همچنین، اهمیت استفاده از محصولات بومی نظیر دهان‌شویه‌های گیاهی، مطالعه‌ی حاضر با هدف مقایسه‌ی دهان‌شوی‌ی کلرهگزیدین با دهان‌شوی‌ی Stop-snoring در پیش‌گیری از پنومونی مرتبط با دستگاه تهویه مکانیکی در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهراء (س) اصفهان طراحی شد.

### روش‌ها

پژوهش حاضر، به صورت یک آزمایش تصادفی شده بر روی ۸۶ بیمار بستری در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهراء (س) اصفهان در سال ۱۳۹۶ اجرا شد.

چک لیست‌هایی که توسط محقق طراحی شده بود، در اختیار قیم فرد متصل به دستگاه تهویه مکانیکی قرار گرفت و رضایت وی جهت شرکت در مطالعه اخذ گردید. اطلاعات لازم برای انجام این پژوهش، از طریق تکمیل این چک لیست‌ها جمع‌آوری گردید. بیماران متصل به دستگاه تهویه مکانیکی که قیم آنان جهت شرکت در مطالعه اعلام رضایت نمودند، وارد مطالعه شدند. همچنین، بیمارانی که در طی دوره‌ی مطالعه به هر دلیلی فوت کردند یا لوله‌ی تراشه‌ی آن‌ها با تشخیص پزشک خارج گردید، از مطالعه خارج شدند. بیماران واجد شرایط ورود به مطالعه، با استفاده از نرم‌افزار تصادفی‌ساز Random allocation به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند و به روش تصادفی‌سازی ساده، یکی در میان در دو گروه قرار گرفتند. گروه اول، شامل ۴۳ بیمار بودند که مراقبت و شستشوی دهان در آنان با استفاده از دهان‌شوی‌ی کلرهگزیدین ۰/۲ انجام شد. گروه دوم، شامل ۴۳ بیمار بودند که مراقبت و شستشوی دهان در آنان با استفاده از دهان‌شوی‌ی گیاهی Stop-snoring انجام شد. دفعات، زمان و شیوه‌ی دریافت دهان‌شویه در هر دو گروه به صورت یکسان و شامل سه بار در هر روز با فواصل زمانی ۸ ساعته بود.

عوامل خطر‌سازی که باعث افزایش بروز این بیماری می‌شود، شامل کاهش سطح هوشیاری، خشکی و باز ماندن دهان، میکروآسپیراسیون‌های ترشحات و کلونیزاسیون باکتری‌ها در مناطق مختلفی مانند اوروفارنکس، سینوس‌ها و پلاک‌های دندانی می‌باشد. حتی ممکن است کلونیزاسیون باکتری از طریق وسایل و ابزار متصل به بیمار به ویژه لوله‌ی تراشه صورت گیرد. در ۲۴ ساعت بعد از بستری بیماران در بخش‌های مراقبت‌های ویژه، به دلیل فقدان حرکت ارادی و غیر ارادی زبان و فک‌ها، نداشتن بلع، عفونت در بخش مراقبت‌های ویژه، به ترتیب ناتوانی در مسواک دندان‌ها، به دلیل داشتن لوله‌ی تراشه و سطح هوشیاری پایین، بیوفیلم یا پلاک تشکیل می‌شود (۸-۱۰).

رشد بالقوه‌ی باکتری‌های پاتوژن در پلاک‌های دندانی، زمینه‌ای از عفونت را برای میکروارگانیزم‌هایی که در ایجاد پنومونی ناشی از تهویه مکانیکی مؤثر هستند، فراهم می‌کند (۱۱-۱۰).

دستورالعمل‌هایی که توسط مرکز پیش‌گیری و کنترل بیماری‌ها در خصوص پیش‌گیری از پنومونی بیمارستانی منتشر شده است، بر تهیه و اجرای یک برنامه‌ی جامع مراقبت از دهان که شامل استفاده از یک ماده‌ی ضد باکتری، در بخش‌هایی که بیماران مستعد ابتلا به پنومونی بیمارستانی هستند، تأکید شده است؛ به صورتی که محققین، بهداشت دهان را به عنوان مهم‌ترین راهبرد برای پیش‌گیری از پنومونی وابسته به تهویه مکانیکی مطرح می‌کنند (۱۴-۱۲).

بنابراین، بهبود و پیشرفت در کیفیت بهداشت دهان مورد توجه قرار گرفته است. دو راه اصلی برای حفظ بهداشت دهان و از بین بردن پلاک دندان و میکروب همراه آن وجود دارد که شامل روش مکانیکی (مسواک) و روش دارویی (شامل آنتی‌بیوتیک‌ها و محلول‌های دهان‌شویه) می‌باشد. استفاده از محلول‌های تمیزکننده‌ی آنتی‌سپتیک نظیر کلرهگزیدین در کاهش بروز پنومونی ناشی از تهویه مکانیکی در بعضی مطالعات مؤثر شناخته شده است (۱۵).

دهان‌شوی‌ی Stop-snoring محصولی گیاهی حاوی تعداد ۱۱ اسانس نعنای، لیمو، میخک، کاج، مریم گلی، اکالیپتوس، آویشن، بادرنجبویه، اسطوخودوس و رازیانه، رزین مصطکی و سدیم فلوراید می‌باشد. اسانس‌های موجود در این فراورده، دارای اثر ضد التهابی، خلط‌آور و آنتی‌باکتریال می‌باشد و اثر ضد میکروبی آن‌ها بیشتر بر روی باکتری‌های گرم مثبت نظیر *Bacillus subtilis* مؤثر می‌باشند. اسانس اکالیپتوس و صمغ بنزوئن همراه با سایر اسانس‌ها اثر با رزی از خود ظاهر می‌سازند که به اثر ضد التهابی دارو کمک می‌نماید. ضمن این که تا به حال، عوارض جانبی از مصرف این دارو گزارش نشده است (۱۶).

از این رو، به لحاظ اهمیت مراقبت‌های بهداشت دهان و دندان

جدول ۱. مقایسه‌ی اطلاعات دموگرافیک در دو گروه مورد مطالعه

مقدار P	گروه کلرگزیدین		گروه
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
< ۰/۹۹۹	۲۶ (۶۰/۴۶)	۲۶ (۶۰/۴۶)	مرد
	۱۷ (۳۹/۵۳)	۱۷ (۳۹/۵۳)	زن
۰/۱۸۰	۴۸/۴۴ ± ۲۰/۱۶	۵۴/۰۶ ± ۱۸/۹۵	سن (سال) [میانگین ± انحراف معیار]
< ۰/۹۹۹	۹ (۲۰/۹۳)	۸ (۱۸/۶۰)	بلی
	۳۴ (۷۹/۰۶)	۳۵ (۸۱/۳۹)	خیر
۰/۸۴۰	۴۸/۵۱	۴۷/۰۹	مدت بستری قبل از ورود به بخش مراقبت‌های ویژه (روز)

### Stop-snoring مورد مطالعه قرار گرفتند.

۶۰/۴۶ درصد (۵۲ نفر) مرد و ۳۹/۵۳ درصد (۳۴ نفر) زن بودند ( $P > ۰/۹۹۹$ ) (جدول ۱). میانگین سن بیماران مورد مطالعه، ۵۲/۲۵ سال (با دامنه‌ی ۱۸-۸۳ سال) بود. میانگین سن بیماران در دو گروه کلرگزیدین ( $۱۸/۹۵ \pm ۵۴/۰۶$  سال) و Stop-snoring ( $۲۰/۱۶ \pm ۴۸/۴۴$  سال) تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P = ۰/۱۸۰$ ) (جدول ۱). همچنین، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه از نظر روزهای بستری قبل از ورود به بخش مراقبت‌های ویژه وجود نداشت ( $P = ۰/۸۴۰$ ) (جدول ۱). از طرف دیگر، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه در مورد استعمال سیگار وجود نداشت ( $P > ۰/۹۹۹$ ) (جدول ۱). در گروه Stop-snoring ۳۲ نفر (۷۴/۴۱ درصد) و در گروه کلرگزیدین ۲۷ نفر (۶۲/۷۹ درصد) دچار پنومونی شدند ( $P = ۰/۳۵۳$ ).

در گروه کلرگزیدین، ۶ نفر (۲۲/۲۲ درصد) قبل از روز پنجم و ۲۱ نفر (۷۷/۷۷ درصد) پس از روز پنجم دچار پنومونی شدند و در گروه Stop-snoring ۲ نفر (۶/۲۵ درصد) قبل از روز پنجم و ۳۰ نفر (۹۳/۷۵ درصد) پس از روز پنجم دچار پنومونی شدند ( $P = ۰/۱۲۶$ ).

### بحث

در مطالعه‌ی حاضر، دو گروه مورد ارزیابی از نظر جنسیت، سن، استعمال دخانیات و مدت زمان بستری پیش از ICU، تفاوت معنی‌داری نداشتند. این عدم معنی‌داری تفاوت‌ها، می‌تواند حاکی از یکسان‌سازی عوامل مخدوشگر احتمالی در دو گروه باشد تا ارزیابی تفاوت دو گروه مورد بررسی از نظر نتایج استفاده از کلرگزیدین و Stop-snoring، فارغ از عامل مخدوشگر صورت گیرد.

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که روش‌های مراقبت دهان و دندان بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، شامل استفاده از کلرگزیدین و Stop-snoring هیچ ارجحیتی بر یکدیگر در زمان بروز و کاهش میزان بروز پنومونی نداشتند. همچنین، با وجود مراقبت

نام و نوع محلول‌های شستشو با برچسبی پوشانده شد تا پرستاران و پزشک مجری مطالعه از نوع محلول اطلاعی نداشته باشند. روش اجرای دهان‌شویی بدین صورت بود که در ابتدا، یک گاز استریل دور یک آبسالنگ پیچیده می‌شد و پس از آغشته کردن با محلول دهان‌شویی به صورت مسواک استفاده می‌گردید و تمام نواحی دهان اعم از سطوح داخلی و خارجی دندان‌ها، لثه، کام و زبان شستشو داده می‌شد. مقدار مصرف کلرگزیدین ۰/۲ درصد در هر مرحله ۱۰ سی‌سی بود و در خصوص Stop-snoring در هر مرتبه مصرف ۲۵-۲۰ قطره در نصف لیوان آب ترکیب و به روش مشابه استفاده می‌شد. کلیه بیماران وارد شده به مطالعه به مدت ۱۴ روز در طی استفاده از تهویه‌ی مکانیکی تحت نظر قرار گرفتند. بیماران در هر دو گروه در طول مطالعه به صورت روزانه به مدت ۱۴ روز پی‌گیری شدند.

پیامد نهایی در بیماران بروز پنومونی بود. جهت رعایت کورسازی مطالعه، بیماران و پرستاران از قرار گرفتن بیماران در گروه‌های تحت مطالعه آگاهی نداشتند و بدین منظور، محلول‌ها در بطری‌هایی بدون مشخصات و دارای کد که مجری طرح از کدبندی آن‌ها اطلاع داشت، در اختیار پرستاران قرار گرفت. متغیرهای اندازه‌گیری شده در این مطالعه، شامل مشخصات دموگرافیک بیماران (سن بر حسب سال، جنسیت)، مصرف سیگار، روزهای بستری قبل از ورود به بخش مراقبت‌های ویژه و بروز پنومونی بود.

در نهایت، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version 23, IBM Corporation, Armonk, NY) و آزمون‌های Independent sample t و  $\chi^2$  واکاوی شد و متغیرهای اندازه‌گیری شده بین دو گروه تحت مطالعه مقایسه گردید.  $P < ۰/۰۵۰$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در این پژوهش، در مجموع تعداد ۸۶ نفر از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهراء (س) اصفهان در قالب دو گروه ۴۳ نفره‌ی مراقبت دهان و دندان با کلرگزیدین و



بیشتر مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که می‌توان استفاده از کلرهگزیدین به تنهایی یا در ترکیب با سایر روش‌ها را به عنوان دستورالعمل بخش مراقبت‌های ویژه جهت جلوگیری و کاهش پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی به کار برد.

با توجه به افزایش روزافزون استفاده از محصولات گیاهی و جایگزین و وجود محصولات گیاهی شبیه کلرهگزیدین، استفاده از این محصولات با توجه به کارایی و عدم وجود عوارض جدی در بخش مراقبت‌های ویژه، می‌تواند مورد توجه و تحقیق قرار گیرد.

در مطالعه‌ی بر روی بیماران بخش مراقبت‌های ویژه، محلول دهان‌شوی‌ی گیاهی اکتیناسه در مقایسه با کلرهگزیدین جهت جلوگیری از بروز پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی بررسی شده است. نتایج این مطالعه نشان داد، استفاده از محلول دهان‌شوی‌ی اکتیناسه و کلرهگزیدین در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بر بهداشت دهان دارای تأثیر مشابهی بوده است و استفاده از دهان‌شوی‌ی اکتیناسه با توجه به مزیت‌های ترکیبات گیاهی آن به عنوان یک جایگزین مناسب برای کلرهگزیدین پیشنهاد شد (۲۷).

یکی از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر، عدم تقسیم‌بندی بیماران از نظر درجه‌ی بیهوشی بر اساس معیارهای American Society of Anesthesiologists (ASA) و شدت بیماری زمینه‌ای می‌باشد که به خودی خود، ممکن است بر میزان مرگ و میر بیماران، فارغ از نوع دهان‌شویه تأثیر بگذارند.

نتیجه‌گیری نهایی این که فراوانی بروز پنومونی در بین بیماران دو گروه و همچنین، زمان بروز پنومونی در هر دو گروه مشابه است. از این رو، استفاده از محلول گیاهی با توجه به عوارض شیمیایی کمتر توصیه می‌گردد. با توجه به عدم وجود دستورالعمل‌های خاص در خصوص استفاده از دهان‌شویه در این بیماران و اهمیت توجه به بهبود و کاهش پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی، انجام مطالعات بیشتر و استفاده از سایر داروها ضروری به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این نوشته نهایت تقدیر و تشکر را از همکاران بخش مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان الزهرای (س) اصفهان اعلام می‌دارند. این مطالعه در قالب طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۹۵۴۴۶ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان اجرا شده است.

دهان و دندان بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه به یکی از دو روش پیش‌گفته، همچنان میزان بروز پنومونی دیررس (پنومونی پس از روز پنجم) در بین بیماران مورد مطالعه همچنان به نسبت بالا بود. البته، کاهش قابل توجهی در پنومونی زودرس (پنومونی قبل از روز پنجم) به ویژه در گروه Stop-snooring مشاهده گردید.

محلول دهان‌شوی‌ی کلرهگزیدین، یک ضد عفونی کننده و گندزدای Base biguanida است که بر طیف وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها مؤثر است و تا کنون هیچ گونه مقاومت میکروبی و اثر سرطان‌زایی نیز برای آن گزارش نشده است (۱۸-۱۹).

در مطالعات Kanafani و همکاران (۲۰) و نیز زند و همکاران (۲۱) به صورت جداگانه، تأثیرات دهان‌شویه با محلول کلرهگزیدین در کاهش عفونت‌های بیمارستانی به خصوص عفونت‌های تنفسی نشان داده شده است (۲۱-۲۰). در مطالعات دیگر، بر بیماران بستری در بخش‌های مختلف مراقبت‌های ویژه با استفاده از دهان‌شوی‌ی کلرهگزیدین، سبب کاهش بروز پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی و همچنین، کوتاه‌تر شدن مدت باقی ماندن لوله‌ی تراشه شده است (۲۴-۲۲، ۱۳). از طرفی، در سایر مطالعات انجام شده، مزیتی برای استفاده از دهان‌شوی‌ی کلرهگزیدین در کاهش بروز پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی و کلونی‌های بیماری‌زا در دهان، در گروه مورد مشاهده نشد و از سوی دیگر، نتایج مطالعات نیز تفاوتی در بروز پنومونی، مدت زمان بستری و میزان مرگ و میر بین بیمارانی که از دهان‌شوی‌ی کلرهگزیدین استفاده می‌کردند، نشان نداده است (۲۵-۲۴، ۱۶).

نتایج مطالعه‌ی مروری Shi و همکاران که به بررسی اثر مراقبت بهداشت دهان بر پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی پرداخته است، حاکی از آن است که دهان‌شوی‌ی کلرهگزیدین ۴۰ درصد خطر بروز پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی در بیماران بستری در این بخش‌ها را کاهش داده است، اما نتایج این مطالعه، تفاوت معنی‌داری در خصوص مرگ و میر، طول مدت اقامت در بخش مراقبت‌های ویژه و طول مدت تهویه‌ی مکانیکی در استفاده از کلرهگزیدین نشان نداده است (۲۶).

همان‌طور که از نتایج مشاهده می‌شود، بیشتر مطالعات تأثیر مثبت کلرهگزیدین به تنهایی یا در ترکیب با سایر داروها در کاهش پنومونی ناشی از تهویه‌ی مکانیکی را در مقایسه با دارونما نشان داده است، اما اغلب این مطالعات، عدم تفاوت تأثیر این دارو در مرگ و میر، طول مدت اقامت در بخش مراقبت ویژه و طول مدت تهویه‌ی مکانیکی را در مقایسه با دارونما گزارش کرده‌اند. از طرفی،



## References

- Cecil RLF, Goldman L, Ausiello DA. Cecil Medicine. Philadelphia, PA: Saunders; 2008.
- Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respir Care* 2005; 50(6): 725-39.
- Tsai HH, Lin FC, Chang SC. Intermittent suction of oral secretions before each positional change may reduce ventilator-associated pneumonia: a pilot study. *Am J Med Sci* 2008; 336(5): 397-401.
- Rathod A, Soni S, Patel K, Vegad MM, Kumari M, Gandhi P. Prevalence of various bacterial pathogens causing ventilator associated pneumonia (VAP) isolated from ICU in tertiary care hospital. *Natl J Integr Res Med* 2017; 8(2): 28-30.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Douglas RG. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7<sup>th</sup> ed. London, UK: Churchill Livingstone; 2010.
- Hutchins K, Karras G, Erwin J, Sullivan KL. Ventilator-associated pneumonia and oral care: a successful quality improvement project. *Am J Infect Control* 2009; 37(7): 590-7.
- Kollef MH. The prevention of ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med* 1999; 340(8): 627-34.
- Basharad N. Incidences of ventilator-associated pneumonia in patients in intensive care units in Masih Daneshvari Hospital [PhD Thesis]. Tehran, Iran: Shahid Beheshti University of Medical Sciences; 2007 [In Persian].
- Panchabhai TS, Dangayach NS, Krishnan A, Kothari VM, Karnad DR. Oropharyngeal cleansing with 0.2% chlorhexidine for prevention of nosocomial pneumonia in critically ill patients: an open-label randomized trial with 0.01% potassium permanganate as control. *Chest* 2009; 135(5): 1150-6.
- Grap MJ, Munro CL, Hamilton VA, Elswick RK, Jr., Sessler CN, Ward KR. Early, single chlorhexidine application reduces ventilator-associated pneumonia in trauma patients. *Heart Lung* 2011; 40(5): e115-e122.
- Li Y. Progress on the modern nursing of pneumonia pathogenic bacteria of ventilator-associated pneumonia. *Journal of Nursing* 2018; 5(4): 7-9.
- DeRiso AJ, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* 1996; 109(6): 1556-61.
- Houston S, Hougland P, Anderson JJ, LaRocco M, Kennedy V, Gentry LO. Effectiveness of 0.12% chlorhexidine gluconate oral rinse in reducing prevalence of nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. *Am J Crit Care* 2002; 11(6): 567-70.
- Berry AM, Davidson PM, Masters J, Rolls K. Systematic literature review of oral hygiene practices for intensive care patients receiving mechanical ventilation. *Am J Crit Care* 2007; 16(6): 552-62.
- Segers P, Speekenbrink RG, Ubbink DT, van Ogtrop ML, de Mol BA. Prevention of nosocomial infection in cardiac surgery by decontamination of the nasopharynx and oropharynx with chlorhexidine gluconate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 296(20): 2460-6.
- Chlebicki MP, Safdar N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: A meta-analysis. *Crit Care Med* 2007; 35(2): 595-602
- Craven DE. What is healthcare-associated pneumonia, and how should it be treated? *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19(2): 153-60.
- Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical periodontology and implant dentistry. 3<sup>rd</sup> ed. Copenhagen, Denmark: Munksgaard; 1997.
- Tang HJ, Chao CM, Leung PO, Lai CC. An Observational Study to Compare Oral Hygiene Care With Chlorhexidine Gluconate Gel Versus Mouthwash to Prevent Ventilator-Associated Pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017; 38(5): 631-2.
- Kanafani ZA, Kara L, Hayek S, Kanj SS. Ventilator-associated pneumonia at a tertiary-care center in a developing country: incidence, microbiology, and susceptibility patterns of isolated microorganisms. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24(11): 864-9.
- Zand F, Zahed L, Mansouri P, Dehghanrad F, Bahrani M, Ghorbani M. The effects of oral rinse with 0.2% and 2% chlorhexidine on oropharyngeal colonization and ventilator associated pneumonia in adults' intensive care units. *J Crit Care* 2017; 40: 318-22.
- Ghazvini K, Ghanaat J, Malek Jafarian M, Yazdan Panah M, Lrani N. incidence of nosocomial pneumonia and bacterial agents causing this infection in intensive care unit in Ghaem Educational Hospital in Mashhad. *J Ilam Univ Med Sci* 2005; 13(4): 55-61. [In Persian].
- Genuit T, Bochicchio G, Napolitano LM, McCarter RJ, Roghman MC. Prophylactic chlorhexidine oral rinse decreases ventilator-associated pneumonia in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2001; 2(1): 5-18.
- Grap MJ, Munro CL, Elswick RK, Jr., Sessler CN, Ward KR. Duration of action of a single, early oral application of chlorhexidine on oral microbial flora in mechanically ventilated patients: A pilot study. *Heart Lung* 2004; 33(2): 83-91.
- Fourrier F, Dubois D, Pronnier P, Herbecq P, Leroy O, Desmettre T, et al. Effect of gingival and dental plaque antiseptic decontamination on nosocomial infections acquired in the intensive care unit: a double-blind placebo-controlled multicenter study. *Crit Care Med* 2005; 33(8): 1728-35.
- Shi Z, Xie H, Wang P, Zhang Q, Wu Y, Chen E, et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; (8): CD008367.
- SafarAbadi M, rezaei K, Ghaznavirad E. Comparing the effect of Echinacea and chlorhexidine mouthwash on oral health in patients hospitalized in intensive care units. *Complement Med J Fac Nurs Midwifery* 2012; 2(3): 222-34. [In Persian].

## Comparison of Effects of Chlorhexidine Mouthwash versus Stop-Snoring Mouthwash in Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia

Sayed Taghi Hashemi<sup>1</sup>, Babak Alikiaii<sup>1</sup>, Mohammad Ali Fallah-Medvari<sup>2</sup>,  
Fatemeh Karimi<sup>2</sup>, Abolfazl Fallah-Medvari<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Ventilator-associated pneumonia (VAP) is a prevalent infection occurs in intensive care unit (ICU) accompanied with increased complications and mortality. In this study, effects of chlorhexidine mouthwash versus herbal stop-snoring mouthwash on VAP among ICU admitted patients have been compared.

**Methods:** 86 patients admitted at ICU were randomly divided to two equal groups including; group C treated with chlorhexidine mouthwash and group S treated with stop-snoring mouthwash. Patients of both groups were similarly treated for three times a day (including amount, technique and times of mouth washing). Time of incidence and frequency of VAP were compared in two groups.

**Findings:** 74.41% of group S and 62.79% of group C presented VAP (P-value = 0.353). 22.22% of patients presented VAP in first-5-days and 77.77% after 5 days and in group S while 6.25% of patients of group C presented VAP in first-5-days and 93.75% after 5 days (P-value = 0.126).

**Conclusion:** Time of VAP incidence or frequency of VAP was not different using chlorhexidine mouthwash versus herbal stop-snoring mouthwash for prevention of VAP.

**Keywords:** Chlorhexidine, Mouthwashes, Ventilator-associated pneumonia

**Citation:** Hashemi ST, Alikiaii B, Fallah-Medvari MA, Karimi F, Fallah-Medvari A. **Comparison of Effects of Chlorhexidine Mouthwash versus Stop-Snoring Mouthwash in Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(471): 227-32.

1- Assistant Professor, Department of Anesthesiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
2- Student of Medicine, Student Research Committee, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
**Corresponding Author:** Babak Alikiaii, Email: alikiaii@yahoo.com

## امکان شناسایی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به روش

## Enzyme-Linked Aptamer Assay و مقایسه‌ی آن با روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

حمیدرضا میانه‌ساز<sup>۱</sup>، حسین خان‌احمد<sup>۲</sup>، مینا میریان<sup>۳</sup>، مریم بشتام<sup>۴</sup>، سید نظام‌الدین حسینی<sup>۵</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** کیت‌های تشخیص بالینی ویروس هپاتیت B، بر اساس آنتی‌بادی می‌باشند و از نظر حساسیت، پایداری و هزینه دارای نواقصی هستند. از این رو، تحقیقات در جهت جایگزینی آبتامرها به جای آنتی‌بادی شاید این نواقص را جبران کند. در این مطالعه، از آبتامر بیوتینه در بررسی امکان شناسایی اختصاصی Hepatitis B surface antigen (HBsAg) با سیستم بیوتین- استرپتاویدین و روش Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) استفاده شد.

**روش‌ها:** HBsAg به وسیله‌ی بافر کربنات- بی کربنات دارای pH معادل ۹/۴ با در نظرگیری متغیرهای مختلف در پلیت Maxibinding (SPL, Korea) تثبیت شد. تثبیت HBsAg با کیت ELISA تجاری بررسی شد. قطعه‌ی آبتامر کلون شد و از پلاسمید به عنوان الگو در Imbalance polymerase chain reaction (Imbalance PCR) جهت تولید DNA تک رشته‌ای استفاده و این روش بهینه شد. از آبتامر بیوتینه با استفاده از سیستم استرپتاویدین- بیوتین در روش ELAA استفاده شد.

**یافته‌ها:** تثبیت آنتی‌ژن با استفاده از کونزوگه‌ی ۱ و ۲ کیت تجاری اثبات شد. کلونینگ قطعه‌ی آبتامر در Escherichia coli Top10 (E. coli Top10) توسط Colony PCR تأیید شد. بهترین نتیجه‌ی PCR گرادیان دمای اتصال پرایمر در ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. گروه شاهد آزمایش‌ها، گویای تثبیت صحیح آنتی‌ژن بود، اما هر دو آبتامر سنتتیک و آبتامر Imbalance PCR، سیگنال‌های تکرارپذیر و اختصاصی مبین شناسایی و اتصال آبتامر به HBsAg را نشان ندادند.

**نتیجه‌گیری:** در هنگام تثبیت آنتی‌ژن، ساختار آن نسبت به آنتی‌ژن موجود در سطح ویروس یا سلول تغییر می‌کند. شاید علت نتایج منفی، توانایی آبتامر در شناسایی آنتی‌ژن با ساختار دست نخورده باشد. همچنین، احتمال می‌رود اتصال بیوتین به آبتامر، موجب تداخل در ساختار آن شود و استفاده از بازوی رابط بین افزونه و آبتامر نیاز به بررسی دارد.

**واژگان کلیدی:** آبتامرها، DNA، Enzyme-linked immunosorbent assay، هپاتیت B، آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس هپاتیت B

**ارجاع:** میانه‌ساز حمیدرضا، خان‌احمد حسین، میریان مینا، بشتام مریم، حسینی سید نظام‌الدین. امکان شناسایی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به روش Enzyme-Linked Aptamer Assay و مقایسه‌ی آن با روش Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۱): ۲۳۳-۲۴۰

بیماری دست و پنجه نرم می‌کنند (۲-۳). عامل مهم و ضروری در تشخیص و درمان این بیماری آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (Hepatitis B surface antigen یا HBsAg) می‌باشد. بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن، افرادی هستند که به مدت ۶ ماه از نظر HBsAg مثبت باشد (۴). پس از شناسایی آنتی‌بادی‌ها، روش Enzyme-

## مقدمه

هپاتیت یا التهاب بافت کبد یک بیماری ویروسی خطرناک است که حدود ۸۸ درصد جمعیت جهان در مناطق با شیوع بالا و متوسط آن زندگی می‌کنند (۱). اگر چه بسیاری از افراد ناقل ویروس هپاتیت B فاقد علائم خاصی هستند، حدود ۲۵۷ میلیون نفر در جهان با این

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشیار، بخش تولید واکسن هپاتیت B، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

## روش‌ها

در این مطالعه، ابتدا تثبیت آنتی‌ژن با در نظر گرفتن متغیرهای مختلف بهینه شد. بدین منظور، آنتی‌ژن‌های نوترکیب HBsAg از دو منبع مختلف واکسن هپاتیت B و آنتی‌ژن تخلیص شده توسط انستیتو پاستور تهران (ایران) تهیه شد. در هر دو مورد، ابتدا تشخیص کیفی با استفاده از کیت تجاری تشخیص HBsAg (پیش‌تاز طب، ایران) انجام شد و سپس، با استفاده از بافر تثبیت کننده‌ی کربنات-بی‌کربنات ۰/۲ مولار، آنتی‌ژن مورد نظر در کف چاهک‌های پلیت ELISA تثبیت شد. روش مورد استفاده برای انجام ELISA دستی، روشی مشابه دستور کار کیت تشخیص HBsAg شرکت پیش‌تاز طب بود که توسط راهنمای ELISA (Thermo scientific, USA) بهینه شد (۱۱). در این فرایند، سه غلظت ۰/۳، ۰/۹ و ۲/۵ نانوگرم/میلی‌لیتر از آنتی‌ژن در بافر کربنات/بی‌کربنات تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت در چاهک‌ها ریخته شد. لازم به ذکر است که برای تصدیق تکرارپذیری نتایج، برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. به یک چاهک نیز آنتی‌ژن افزوده نشد و به عنوان چاهک شاهد در نظر گرفته شد.

چاهک‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و پس از ۲ مرتبه شستشو با بافر شستشوی ۱ x (سیتومتن ژن، ایران) (۱۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH معادل ۷/۴، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و ۰/۰۵ درصد Tween 20) و خشک کردن چاهک‌ها روی دستمال جذب، مسدودسازی با استفاده از ۳۰۰ میکرولیتر Skimmed milk (۵ درصد در Phosphate buffered saline یا PBS) به ازای هر چاهک و انکوباسیون ۱ ساعته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس، محتویات تخلیه شد و پس از ۲ مرتبه شستشو، ۲۵ میکرولیتر کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ کیت تجاری پیش‌تاز طب که حاوی آنتی‌بادی بیوتینه‌ی ضد HBsAg می‌باشد، در چاهک‌ها به جز چاهک شاهد ریخته شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. آن گاه، بدون شستشو ۲۵ میکرولیتر کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیش‌تاز طب که حاوی استرپتاویدین و آنزیم HRP متصل به بیوتین است، به هر چاهک به جز چاهک شاهد افزوده شد و بار دیگر، ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، محتویات تخلیه شد و بعد از ۳ مرتبه شستشو و خشک کردن، ۱۰۰ میکرولیتر سوپسترای آنزیم HRP (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) با TMB (Sigma Aldrich, USA) به هر چاهک افزوده و ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال، واکنش در چاهک‌ها متوقف شد و میزان

linked immunosorbent assay (ELISA) ابداع شد و شناسایی و تشخیص بسیاری بیماری‌ها بر مبنای آن امکان پذیر گردید. تا کنون برای تشخیص این بیماری، کیت‌های تشخیص آزمایشگاهی مارکر ویروسی HBsAg بر اساس ELISA ساندویچی تهیه شده است و آنتی‌بادی‌ها نیز به عنوان عامل تثبیت کننده‌ی آنتی‌ژن و هم به عنوان عامل تشخیصی در آن‌ها به کار رفته‌اند (۵).

آنتی‌بادی‌ها، مولکول‌های با اتصال اختصاصی و قوی به مولکول هدفشان هستند که طیف گسترده‌ای از کاربردها مانند خالص‌سازی، جداسازی و تشخیص اختصاصی یک ماده از میان انبوهی از مواد را امکان‌پذیر می‌سازند، اما با وجود مزایای این مولکول‌ها، محدودیت‌هایی نظیر ناپایداری حرارتی، تولید در شرایط زنده، هدف‌گیری اهداف محدود، تغییرات در سری‌های مختلف تولید و هزینه‌ی تمام شده‌ی بالا برای تولید، استفاده از آن‌ها را محدود کرده است (۶)، اما در سال‌های اخیر، مولکول‌های دیگری با خواص اتصال قوی و اختصاصی به مولکول هدف، تحت عنوان آپتامر معرفی شده‌اند (۷) که بسیاری از محدودیت‌های موجود در مورد آنتی‌بادی‌ها را ندارند. این در حالی است که ثابت تفکیک (Dissociation constant) آنتی‌بادی و آپتامر که نشان دهنده‌ی میل ترکیبی آن‌ها به مولکول هدف می‌باشد، به طور تقریبی یکسان است و حدود ۵۰-۰/۱ نانومولار می‌باشد (۸).

بنابراین، استفاده از آپتامرها در بسیاری موارد، مفیدتر از آنتی‌بادی‌ها به نظر می‌رسد (۶). از طرف دیگر، DNA آپتامرها در مقایسه با RNA آپتامرها دارای مزایایی همچون عدم حساسیت به RNase، عدم نیاز به سنتز cDNA و سنتز شیمیایی ارزان‌تر هستند (۹). بر این مبنای روش جدیدی با استفاده از آپتامرها مشابه ELISA به وجود آمد که ارزان‌تر و کارآمدتر است و تحت عنوان روش Enzyme-linked aptamer assay (ELAA) شناخته می‌شود.

حال با توجه به اهمیت بیماری هپاتیت و لزوم شناسایی سریع و درمان آن از یک سو و هزینه‌ی بالای تشخیص این بیماری از سوی دیگر و همچنین، با توجه به مزایای آپتامرها نسبت به آنتی‌بادی‌ها، به نظر می‌آید جایگزینی آپتامر ضد مارکر ویروسی HBsAg در کیت‌های تشخیصی موجب کارایی بهتر و هزینه‌ی کمتر کیت‌ها گردد. این در حالی است که در پژوهشی دیگر، DNA آپتامری ضد این آنتی‌ژن، با پایداری و ویژگی (Specificity) مناسب توسط خان‌احمد و همکاران تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفته است (Unpublished). بنابراین، تصمیم گرفته شد در این مطالعه، از آپتامر ضد HBsAg جهت شناسایی آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B به جای آنتی‌بادی با بهره‌گیری از سیستم تقویت سیگنال بیوتین-استرپتاویدین و آنزیم Horseradish peroxidase (HRP) استفاده شود (۱۰).

بار دیگر مقدار مشابهی آنزیم Taq DNA polymerase به هر واکنش اضافه شد و مراحل پیش‌گفته تا مجموع ۱۲۰ چرخه انجام گرفت. غلظت محصول حاصل از Imbalance PCR در نهایت با نانودراپ (Nanospec cube, Germany) اندازه‌گیری شد.

برای تهیه‌ی آپتامر سنتتیک، به شرکت ژن فن‌آوران، سفارش ساخت توالی آپتامر که در انتهای 5' آن بیوتین اضافه شده بود، داده شد. پس از تهیه‌ی آپتامرها مانند قبل، HBsAg در کف پلیت‌ها تثبیت شد. سپس، مطابق دستور کار استفاده شده برای اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌های تثبیت شده، این بار به چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن، آپتامر اضافه شد. آپتامرهای متصل شده به آنتی‌ژن‌های تثبیت شده پس از شستشو در کف چاهک‌ها، متصل باقی می‌ماند و به واسطه‌ی بیوتین باعث تولید سیگنال می‌شوند. این کار، با روش تقویت سیگنال استرپتاویدین و آنزیم HRP متصل به دو مولکول بیوتین که در اصطلاح به آن Avidine biotin complex (ABC) گفته می‌شود، انجام شد. سیستم استرپتاویدین-بیوتین، در قالب کیت (Vector Lab, USA) با نام تجاری ABC Kit خریداری شد. در همه‌ی آزمایش‌ها، گروه شاهد (گروه‌های A<sub>1</sub> و A<sub>2</sub>) برای اطمینان از صحت انجام ELAA تعریف شد. سپس، مراحل آزمایش به دو مرحله‌ی جداگانه تقسیم شد.

در مرحله‌ی اول پس از تثبیت آنتی‌ژن، آپتامر به آن اضافه شد. در این مرحله، به طور جداگانه آپتامر تهیه شده از هر دو منبع، مورد بررسی قرار گرفت. از این رو، غلظت ۲ میکرومولار از هر دو آپتامر تهیه شد. از طرف دیگر، سیستم تشخیص استرپتاویدین-بیوتین نیز از دو منبع متفاوت، از کیت ABC و کونزوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیشتاز طب (پیشتاز طب، ایران) تأمین شد. سپس، ۳ گروه برای انجام آزمایش‌ها طراحی شدند. در گروه A<sub>1</sub> کونزوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونزوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیشتاز طب (استرپتاویدین - HRP)، در گروه B<sub>1</sub> آپتامر به جای آنتی‌بادی و کونزوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پیشتاز طب و در گروه C<sub>1</sub> نیز از آپتامر و کیت ABC استفاده شد.

سپس، در مرحله‌ی دوم، تأثیر چند متغیر از جمله بافر اتصال آپتامر، مدت زمان مسدودسازی و حلال مورد استفاده برای ساخت محلول ۵ درصد (وزنی - حجمی) Skimmed milk روی اتصال آپتامر به آنتی‌ژن بررسی شد. از این رو، ۲ گروه شامل گروه A<sub>2</sub> با کونزوگه‌ی شماره‌ی ۱ و ۲ کیت پیشتاز طب و گروه B<sub>2</sub> با آپتامر محلول در Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) کیت ABC، برای انجام آزمایش‌های این مرحله در نظر گرفته شدند. سپس، از DPBS به جای آب مقطر به عنوان حلال آپتامر (بافر اتصال) استفاده شد و مرحله‌ی مسدودسازی به صورت شبانه صورت گرفت.

جذب رنگ زرد حاصل شده توسط فیلتر ۴۵۰ نانومتر دستگاه خوانشگر ELISA (BIORAD, USA) اندازه‌گیری شد.

سپس، آپتامر ضد HBsAg به دو طریق شامل روش Imbalance polymerase chain reaction (Imbalance PCR) و روش سنتتیک تهیه گردید. برای تهیه‌ی آپتامر به روش Imbalance PCR، ابتدا قطعه‌ی آپتامر به کمک وکتور پلاسمیدی pUC57 در میزبان Escherichia coli Top10 (E. coli Top10) کلون شد. بدین منظور، قطعه‌ی آپتامر که دارای دو انتهای چسبنده‌ی 3' باز A بود، در وکتور پلاسمیدی خطی دارای انتهای چسبنده‌ی 3' باز T (Fermentas, USA) دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کلون شد و پلاسمید حلقوی حاصل در باکتری E. coli Top10 به روش CaCl<sub>2</sub> سرد و شوک حرارتی ترانسفورم (Transform) گردید. سپس، تک کلون‌های ترانسفورم شده به وسیله‌ی کشت روی محیط Luria-Bertani agar (LB Agar) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب شد و جهت تأیید کلونی‌های حاوی قطعه، با کمک پرایمرهای عمومی فاز M13، Colony PCR انجام شد. سپس، از این کلونی‌ها به وسیله‌ی کیت Solg™ plasmid mini-prep kit (SolGent, Korea) پلاسمید استخراج و برای تأیید نهایی وجود قطعه‌ی مورد نظر در آن‌ها، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه (پرایمر پیشرو: 5'-biotin-ATCATCCAGCTTATTCAATT-3' و پرایمر معکوس 3'-CTTCTCCTGCACACTTACTAT-5') PCR انجام شد. لازم به ذکر است PCR با گرادیان دمایی انجام گردید تا دمای اتصال بهینه به دست آید.

سپس، با استفاده از هر دو پرایمر پیشرو و معکوس، ۱۵ چرخه‌ی واکنش PCR معمولی روی پلاسمید دارای قطعه به عنوان الگو انجام شد و محصول آن به عنوان الگو در واکنش Imbalance PCR مورد استفاده قرار گرفت؛ به طوری که برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری، ۱ میکرولیتر محصول PCR به عنوان الگو (۴۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) به همراه ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر محلول MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد بین‌الملل/میکرولیتر) و ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر رقیق نشده‌ی پیشرو (۱۰۰ میکرومولار) و ۱۸/۲ میکرولیتر آب استریل در یک تیوب ریخته و PCR شد. برنامه‌ی PCR عبارت از ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۵ دقیقه، سپس ۴۵ چرخه‌ی متوالی از مراحل شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه و سپس مرحله‌ی نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا انتهای برنامه بود. سپس،



شکل ۲. نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول **Colony polymerase chain reaction (Colony PCR)** بر روی ۱۰ تک کلون به دست آمده از کلونینگ قطعه‌ی آپتامر در باکتری **Escherichia coli Top10 (E. coli Top10)**

ستون‌های ۳ و ۴: باند ۲۸۰ جفت بازی مربوط به کلون‌های ۳ و ۴ (کلون‌های مثبت حاوی توالی آپتامر) و ستون‌های ۱، ۲ و ۵-۱۰ باند ۱۹۰ جفت بازی مربوط به سایر کلون‌ها (کلون‌های منفی بدون قطعه مورد نظر). در این تصویر، از Ladder ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, USA) استفاده شده است.



شکل ۳. نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول

**Imbalance polymerase chain reaction**

**(Imbalance PCR)** بر روی پلاسمید استخراج شده از کلونی ۴

(حاوی قطعه‌ی آپتامر)

ستون ۱ Ladder ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, USA) بوده است، ستون‌های ۲-۶ محصول واکنش‌های به طور کامل مشابه Imbalance PCR و ستون ۷ نمونه‌ی شاهد منفی است.

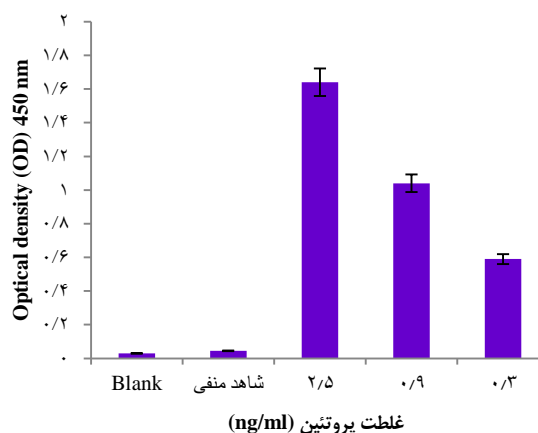
در نتایج مرحله‌ی اول در گروه A<sub>1</sub>، با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها، مقدار جذب نوری ۴۵۰ نانومتر نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت.

همچنین، در گروه‌های B<sub>1</sub> و C<sub>1</sub>، هیچ سیگنال اختصاصی وابسته به غلظت آنتی‌ژن، از اتصال آپتامر (از هیچ یک از دو منبع) به آنتی‌ژن با استفاده از هر دو سیستم تشخیص به دست نیامد (شکل‌های ۴ و ۵).

همچنین، از آب‌مقطر برای تهیه‌ی Skimmed milk ۵ درصد (به جای PBS) و سپس از این محلول برای ساخت معرف‌های کیت ABC استفاده شد. مقایسه‌ی آماری بین مقادیر جذب ۴۵۰ نانومتری غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن در هر گروه از آزمایش‌ها به روش Kruskal-Wallis انجام شد.

**یافته‌ها**

بر اساس یافته‌های شکل ۱ که مربوط به روند تثبیت آنتی‌ژن در چاهک‌ها می‌باشد، میانگین جذب نوری ۴۵۰ نانومتر همراه با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها به صورت معنی‌داری کاهش یافت.



شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف HBsAg

(Hepatitis B surface antigen) (انستیتو پاستور تهران، ایران) تثبیت

شده در چاهک‌های پلیت **Enzyme-linked immunosorbent assay**

(ELISA) در طول موج ۴۵۰ نانومتر

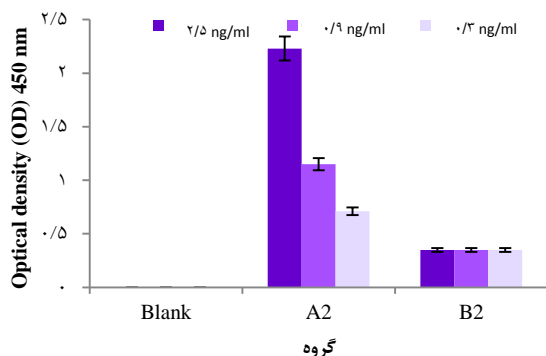
(Error bar)ها نماینده‌ی Standard deviation می‌باشند. NC: شاهد منفی

(در آزمون Kruskal-Wallis  $P = ۰/۰۲۵$ )

نتایج ژل الکتروفورز Colony PCR روی تک کلون‌های حاصل از ترانسفورماسیون (Transformation) نشان داد که کلونی‌های ۳ و ۴ که باند حدود ۲۸۰ نوکلئوتیدی دادند، دارای قطعه‌ی آپتامر می‌باشند؛ در حالی که مابقی، باند حدود ۱۹۰ نوکلئوتیدی ایجاد نمودند و فاقد قطعه‌ی فوق می‌باشند (شکل ۲). وجود باندهای ضعیف در الکتروفورز ژل آگارز، ایجاد DNA تک رشته در Imbalance PCR را تأیید نمود (شکل ۳). غلظت نهایی Single-stranded DNA (ssDNA) حاصل از مخلوط کردن همه‌ی محصولات حاصل از Imbalance PCR ۹۰ نانوگرم/میکرولیتر توسط نانودراپ اندازه‌گیری شد.



نتایج مرحله‌ی دوم آزمایش‌ها روی آپتامر نشان داد که در گروه A<sub>2</sub> با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده، جذب نوری ۴۵۰ نانومتر نیز کاهش یافته است، اما مقادیر جذب نوری گروه B<sub>2</sub> هیچ گونه الگو و ویژگی را نشان نداد (شکل ۶).



شکل ۶. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) تثبیت شده در چاهک‌های پلیت (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay در

مرحله‌ی دوم آزمایش‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر

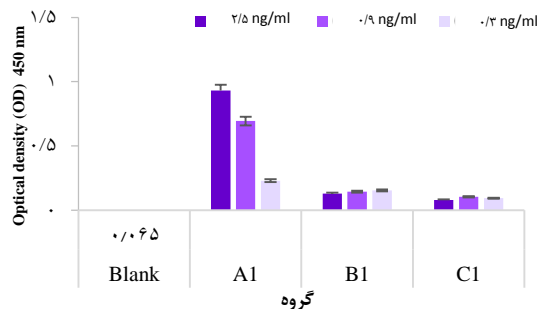
در گروه A<sub>2</sub> از کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب (استرپتایویدین - HRP) استفاده شد. در گروه B<sub>2</sub> از آپتامر سنتتیک محلول در Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) به جای آنتی‌بادی و کیت ABC استفاده شد (Error bar نماینده‌ی Standard deviation هستند).

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis در گروه A<sub>2</sub>  $P = 0/027$ ، در گروه B<sub>2</sub>  $P = 0/990$  به دست آمد.

## بحث

اساس این مطالعه را ایجاد روندی استاندارد برای تثبیت آنتی‌ژن نوترکیب HBsAg در چاهک‌ها تشکیل می‌داد. در مطالعه‌ی این روند (شکل ۱)، میانگین مقادیر جذب نوری همراه با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها، کاهش می‌یابد که این امر، نشان دهنده‌ی ویژگی نسبی و وابستگی مقادیر جذب نوری به دست آمده به میزان آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها می‌باشد. همچنین، تکرارپذیری بالای مقادیر جذب نوری به دست آمده در هر غلظت از آنتی‌ژن که به صورت خطوط خطا در هر ستون نمایان است (شکل ۱)، دقت این روند را نشان می‌دهد. این روند، در ادامه، اساس کار تمامی آزمایش‌ها قرار گرفت و به عنوان شاهده‌ی بر صحت انجام سایر آزمایش‌ها از آن استفاده شد.

در مطالعه‌ی حاضر، هیچ یک از آپتامرهای سنتتیک و تهیه شده به روش Imbalance PCR، سیگنال‌های تکرارپذیر و اختصاصی جهت تشخیص HBsAg نشان ندادند. اگر چه نتایج استفاده از آپتامر سنتتیک در مرحله‌ی اول آزمایش‌ها (شکل ۵) از نظر آماری معنی‌دار



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) تثبیت شده در چاهک‌های

پلیت (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay در

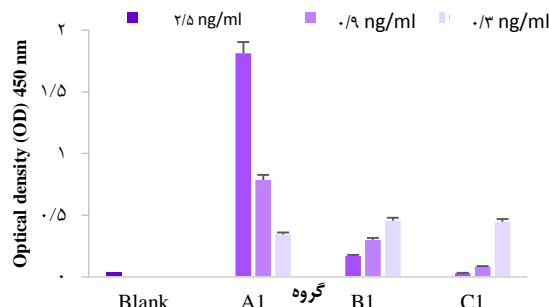
مرحله‌ی اول آزمایش‌ها بر روی آپتامر با استفاده از آپتامر محصول

Imbalance PCR در طول موج ۴۵۰ نانومتر

در گروه A<sub>1</sub> از کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب (استرپتایویدین - HRP) استفاده شد. در گروه B<sub>1</sub> از آپتامر حاصل از Imbalance PCR به جای آنتی‌بادی و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب و در گروه C<sub>1</sub> نیز از آپتامر به جای آنتی‌بادی و کیت ABC استفاده شد (Error bar نماینده‌ی Standard deviation هستند).

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis، در گروه A<sub>1</sub>  $P = 0/027$ ، در گروه B<sub>1</sub>  $P = 0/072$  و در گروه C<sub>1</sub>  $P = 0/120$  به دست آمد.

در مورد آپتامر سنتتیک، سیگنال‌ها علاوه بر ضعیف بودن، با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها، افزایش یافت (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسه‌ی میانگین جذب غلظت‌های مختلف

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) تثبیت شده در

چاهک‌های پلیت (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay در

مرحله‌ی اول آزمایش‌ها با استفاده از آپتامر سنتتیک در

طول موج ۴۵۰ نانومتر

در گروه A<sub>1</sub> از کونژوگه‌ی شماره‌ی ۱ (آنتی‌بادی بیوتینه) و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب (استرپتایویدین - HRP) استفاده شد. در گروه B<sub>1</sub>، از آپتامر سنتتیک به جای آنتی‌بادی و کونژوگه‌ی شماره‌ی ۲ کیت پستاناز طب و در گروه C<sub>1</sub> نیز از آپتامر سنتتیک به جای آنتی‌بادی و کیت ABC استفاده شد (Error bar نماینده‌ی Standard deviation هستند).

بر اساس آزمون Kruskal-Wallis در هر سه گروه A<sub>1</sub>، B<sub>1</sub> و C<sub>1</sub>  $P = 0/027$  به دست آمد.

مقایسه‌ای مشخص گردید که روش ELAA غیر مستقیم با استفاده از آبتامر WKB-14 تمایل و ویژگی بهتری برای تشخیص مایکوپلاسما بویوس (*Mycoplasma bovis*) از خود نشان می‌دهد (۱۶).

Chen و همکاران، در یک Patent، آبتامر بر علیه آلفا-متیل آسیل کوآ ( $\alpha$ -methylacyl-CoA) معرفی کردند که از آن در طراحی کیت تشخیص این ماده بر اساس سیستم ELAA استفاده شد (۱۷). مثال دیگری از این دست، مانند اکراتوکسین A، تجاری‌سازی یک کیت تشخیص آفلاتوکسین بر مبنای آبتامر است (۱۸). اساس این مطالعه، مشابه تحقیق حاضر است؛ به طوری که یک آبتامر تهیه شده بر ضد آفلاتوکسین B1 که دارای افزونه‌ی بیوتین در انتهای 5' است، روی آگارز-استریتاومیدین تثبیت می‌شود و در یک ستون کروماتوگرافی تمایلی به عنوان بخش جامد به کار می‌رود. سپس، از این ستون برای خلص‌سازی و تعیین مقدار آنتی‌ژن مورد نظر استفاده می‌شود. تفاوت این مطالعه با مطالعه‌ی Barthelmebs و همکاران (۱۳) و همچنین، مطالعه‌ی حاضر، در استفاده از ستون کروماتوگرافی به جای تثبیت آنتی‌ژن روی سطح جامد است. در هر دو مطالعه‌ی پیش‌گفته، از روش فلورسنت جهت ایجاد سیگنال استفاده شده است که از این نظر با مطالعه‌ی حاضر متفاوت است.

از مقایسه‌ی مطالعه‌ی حاضر با سایر مطالعات انجام شده، چنین به نظر می‌رسد که لازم است مطالعه‌ی حاضر با یک سری تغییرات تکرار شود. اول این که از سایر آبتامرهای معرفی شده برای HBsAg استفاده شود. برای مثال، Xi و همکاران، به معرفی چند آبتامر با ویژگی و میل ترکیبی بالا برای HBsAg پرداخته‌اند. در این مطالعه، جداسازی آبتامرها با استفاده از Magnetic nano particles (MNPs) و با بهره‌گیری از روش SELEX انجام گرفته است و نتیجه‌ی آن DNA آبتامرهای ۴۰ بازی با نام‌های H01، H02 و H03 است (۱۹). دومین تغییر، این است که شاید بهتر باشد از سیستم‌های تشخیصی متفاوت دیگر همچون سیستم‌های فلورسنت و کمی لومینسانس در مطالعه بهره گرفت. همچنین، فاصله‌ی مناسب بین افزونه (Modification) و آبتامر به وسیله‌ی یک بازوی کربنی جهت جلوگیری از ایجاد تأثیرات منفی افزونه در ساختار سه بعدی آبتامر لحاظ شود. از دیگر نکاتی که باید در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرد، تغییرات لازم در نوع بافر اتصال مناسب آبتامر به آنتی‌ژن و مدت زمان و درجه‌ی حرارت مناسب جهت انکوباسیون آن‌ها و نیز مسدودسازی بنیان‌های آزاد کف پلیت به گونه‌ای است که کمترین میزان از سیگنال‌های پس زمینه و ناخواسته ایجاد شود. نکته‌ی قابل توجه دیگر این است که شاید روش‌های پیچیده‌تری مانند Sandwich ELAA که در آن می‌بایست آبتامر به وسیله‌ی افزونه‌ای مناسب مانند بیوتین/نوترایدین در کف چاهک‌ها تثبیت شود و در

بود، اما از آن جایی که در گروه‌های B<sub>1</sub> و C<sub>1</sub> میزان سیگنال‌ها بسیار کم بود و مهم‌تر از آن با کاهش غلظت آنتی‌ژن تثبیت شده این سیگنال‌ها افزایش می‌یافت؛ به این نتایج نمی‌توان اتکا نمود. چنانچه در مطالعات مختلف، علاوه بر معنی دار بودن آماری داده‌ها کاربرد بالینی این داده‌ها نیز لازمه‌ی اثبات ادعای مطالعه می‌باشد.

یکی از دلایل احتمالی این نتیجه، می‌تواند استفاده از بافر تثبیت کننده باشد. همان‌طور که پیش از این ذکر شد، آبتامر بر خلاف آنتی‌بادی برای آن که به طور اختصاصی آنتی‌ژن را شناسایی کند، باید با آنتی‌ژنی دست نخورده و با ساختار فضایی مناسب روبه‌رو شود. در حالی که برای آنتی‌بادی در بیشتر موارد اپی‌توپ‌های خطی و پروتئین‌های به نسبت دنا توره شده نیز قابل شناسایی است (۱۲). از این رو، ممکن است شرایط بافری مانند pH بافر تثبیت کننده، ساختار آنتی‌ژن را به قدری تغییر دهد که دیگر برای آبتامر قابل شناسایی نباشد، اما کماکان برای آنتی‌بادی قابل شناسایی باشد. نتایج همه‌ی آزمایش‌های گروه‌های A که در بر گیرنده‌ی آنتی‌بادی هستند، گواهی بر این مدعا می‌باشد.

البته، این مسأله که یک آبتامر در فلوسایتومتري نتایج خوبی داشته، اما در روش ELAA کارایی نداشته باشد، در مورد آنتی‌بادی‌ها نیز صادق است و در موارد زیادی شرکت سازنده‌ی یک آنتی‌بادی، محصول خود را فقط برای یک نوع آزمایش مانند Western-blot ارایه می‌نماید، اما برای استفاده در فلوسایتومتري توصیه نمی‌نماید. همچنین، شاید آبتامر پیش‌گفته به Conformation خاصی از HBsAg متصل می‌شود که فقط در سطح سلول یا ویروس آن ساختار ایجاد می‌شود و آنتی‌ژن نو ترکیب چنین ساختاری را ایجاد نمی‌کند. یکی از دلایل احتمالی دیگر، آن است که وجود بیوتین در آبتامرهای ساخته شده، سبب کاهش ویژگی آبتامر می‌گردد و همچنین، بافر مورد استفاده نیز می‌تواند در اتصال اختصاصی بسیار مهم باشد.

تاکنون کیت‌هایی بر اساس آبتامر در زمینه‌های مختلف تهیه شده است. برای مثال، در زمینه‌ی سموم غذایی، چندین کیت با روش ELISA که مبنای آن آنتی‌بادی است، برای سم آکراتوکسین A تهیه شده است، اما پس از تهیه‌ی آبتامرهای H8 و H12، اولین کیت ELAA برای این سم ساخته شد (۱۳). همچنین، برای شناسایی دقیق آدیپونکتین، برای تشخیص زودرس دیابت نوع ۲، روشی که به طور هم‌زمان از آنتی‌بادی و آبتامر استفاده می‌کند، به نام Enzyme-linked aptamer assays (ELAAs) مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴). در تحقیق دیگری، Gu و همکاران، DNA آبتامری که به طور اختصاصی با میل ترکیبی بالا به Okadic acid متصل می‌شود، به دست آوردند. سپس، آن را در شناسایی سم پیش‌گفته در روش ELAA به کار بردند (۱۵). همچنین، در یک مطالعه‌ی



## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی طرح ۳۹۵۶۹۶ مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله، از این دانشگاه جهت تأمین هزینه‌های انجام طرح سپاسگزاری می‌گردد.

مرحله‌ی بعد، آنتی‌ژن به محیط اضافه شود، روش‌های کارآمدتری باشد. این روند، علاوه بر آن که مانع تغییرات احتمالی در ساختار آنتی‌ژن حین تثبیت شدن در چاهک‌ها می‌شود، با قابل اندازه‌گیری کردن آنتی‌ژن‌های تثبیت شده، به یکسان‌سازی و استانداردسازی همه‌ی آزمایش‌ها و همه‌ی چاهک‌ها کمک می‌نماید.

## References

1. Poorolajal J, Majdzadeh R. Prevalence of chronic hepatitis B infection in Iran: A review article. *J Res Med Sci* 2009; 14(4): 249-58
2. World Health Organization. Global hepatitis report, 2017. Geneva, Switzerland: WHO; 2017.
3. Zidan A, Scheuerlein H, Schule S, Settmacher U, Rauchfuss F. Epidemiological pattern of hepatitis B and hepatitis C as etiological agents for hepatocellular carcinoma in Iran and worldwide. *Hepat Mon* 2012; 12(10 HCC): e6894.
4. Kidd-Ljunggren K, Myhre E, Blackberg J. Clinical and serological variation between patients infected with different Hepatitis B virus genotypes. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12): 5837-41.
5. Pishtaz Teb. HBsAg ELISA kit [Online]. Available from: URL: <http://www.pishtazteb.com/product/p25-HBs-Ag>
6. Jayasena SD. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* 1999; 45(9): 1628-50.
7. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249(4968): 505-10.
8. Zhu Q, Liu G, Kai M. DNA aptamers in the diagnosis and treatment of human diseases. *Molecules* 2015; 20(12): 20979-97.
9. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992; 355(6360): 564-6.
10. Nussbaum O. Nucleic acid aptamer-based diagnostic methods with novel techniques for signal enhancement [Patent: EP2591107A2]. 2013.
11. Thermo Scientific. ELISA technical guide and protocols (TECH TIP # 65) [Online]. [cited 2017]; Available from: URL: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>
12. Mayer G. The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009; 48(15): 2672-89.
13. Barthelmebs L, Jonca J, Hayat A, Prieto-Simon B, Marty JL. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control* 2011; 22(5): 737-43.
14. Lee SJ, Park JW, Kim IA, Youn BS, Gu MB. Sensitive detection of adipokines for early diagnosis of type 2 diabetes using enzyme-linked antibody-aptamer sandwich (ELAAS) assays. *Sens Actuators B Chem* 2012; 168: 243-8.
15. Gu H, Duan N, Wu S, Hao L, Xia Y, Ma X, et al. Graphene oxide-assisted non-immobilized SELEX of okadaic acid aptamer and the analytical application of aptasensor. *Sci Rep* 2016; 6: 21665.
16. Fu P, Sun Z, Yu Z, Zhang Y, Shen J, Zhang H, et al. Enzyme-linked aptamer assay: based on a competition format for sensitive detection of antibodies to *Mycoplasma bovis* in serum. *Anal Chem* 2014; 86(3): 1701-9.
17. Chen LC, Yang DK, Hsu CH, Lee MY. Aptamer for detection of alpha-methylacyl-coa racemase and diagnostic kit thereof [Patent: US20160177397A1]. 2016.
18. Penner G. Commercialization of an Aptamer-Based Diagnostic Test [Online]. [cited 2012 5 Sep]; Available from: URL: <https://www.mddionline.com/commercialization-aptamer-based-diagnostic-test>
19. Xi Z, Huang R, Li Z, He N, Wang T, Su E, et al. Selection of HBsAg-specific DNA aptamers based on carboxylated magnetic nanoparticles and their application in the rapid and simple detection of hepatitis B virus infection. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7(21): 11215-23.

## Using Enzyme-Linked Aptamer Assay to Detect Hepatitis B Surface Antigen in Comparison to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Hamidreza Mianesaz<sup>1</sup>, Hossein Khanahmad<sup>2</sup>, Mina Mirian<sup>3</sup>, Maryam Boshtam<sup>4</sup>, Seyed Nezamoddin Hoseini<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Clinical diagnostic kits for detecting hepatitis B are based on antibodies, and have inefficient sensitivity, stability, and cost. Therefore, researches about aptamers and using them instead of antibodies may make these defects up. In this study, a biotinylated anti-hepatitis B virus surface antigen (anti-HBsAg) aptamer sequence was used to evaluate the possibility of specific detection of HBsAg via enzyme-linked aptamer assay (ELAA) method using biotin-streptavidin system.

**Methods:** HBsAg was immobilized in Maxibinding plate (SPL, Korea) by using carbonate-bicarbonate buffer (pH: 9.4), and by considering different variables. Immobilization of HBsAg was evaluated by commercial kit. Aptamer sequence was cloned and imbalance polymerase chain reaction (PCR) was improved and performed using plasmid as DNA template. Then, biotinylated aptamer was utilized in enzyme-linked aptamer assay method via taking advantage of streptavidin-biotin signal amplification system.

**Findings:** Antigen immobilization was set up using conjugates number 1 and 2 of commercial kit. Colony polymerase chain reaction confirmed aptamer cloning in Escherichia coli (E. coli) Top10 host. The best gradient polymerase chain reaction result was achieved at 64 °C annealing temperature. Control group in assays showed accuracy of immobilization; but no repetitive specific signal was obtained that could prove joining of aptamer to HBsAg, and detection of that.

**Conclusion:** Three-dimensional structure of an immobilized antigen on a solid surface may vary from that which exists on the surface of viruses or cells. Negative results might be due to the ability of aptamers to attach into antigens with totally intact shape. Conjugation of aptamer with biotin may interfere in aptamer conformation; so, a connective arm between aptamer and biotin could be a suggestion, which needs more assessments.

**Keywords:** DNA aptamers, Enzyme-linked immunosorbent assay, Hepatitis B, Hepatitis B surface antigens

**Citation:** Mianesaz H, Khanahmad H, Mirian M, Boshtam M, Hoseini SN. Using Enzyme-Linked Aptamer Assay to Detect Hepatitis B Surface Antigen in Comparison to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Isfahan Med Sch 2018; 36(471): 233-40.

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

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

3- PhD, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

4- PhD Candidate, Isfahan Cardiovascular Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Associate Professor, Hepatitis B Vaccine Production Section, The Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Hossein Khanahmad, Email: hossein\_khanahmad@yahoo.com

## miR-135b به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی در بیماران مبتلا به اندومتريوز

سید مهدی کلانتر<sup>۱</sup>، نورالدین کرمی<sup>۲</sup>، صادق زارعی<sup>۳</sup>، سید حمیدرضا میرابوطالبی<sup>۴</sup>، فاطمه منتظری<sup>۵</sup>،  
امیر عبدیان اصل<sup>۵</sup>، مهرداد طالبی اندواری<sup>۲</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** اندومتريوز بیماری وابسته به استروژن است که در آن، سلول‌های اندومتر که در حالت طبیعی داخل رحم وجود دارند، در خارج از رحم دیده می‌شوند. این بیماری، با شیوع تقریبی ۱۷۶ میلیون زن مبتلا در جهان و بار مالی حدود ۱۱ میلیارد دلار در سال، از شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های زنان است. در کنار روش‌های درمانی موجود، استفاده از عوامل اپی‌ژنتیک و به ویژه بررسی تغییر بیان microRNAها جهت تشخیص و درمان بیماری مؤثر واقع شده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان miR-135b در بیماری اندومتريوز بود تا با شناسایی تغییرات این microRNAها بتوان از آن‌ها در تشخیص و درمان استفاده نمود.

**روش‌ها:** از افراد مبتلا به اندومتريوز (۲۵ نفر) و افراد سالم (۲۵ نفر) نمونه‌های بافت و سرم گرفته شد. ابتدا استخراج RNA total انجام شد و سپس به روش‌های PolyA reverse transcription-polymerase chain reaction (PolyA RT-PCR) و Real time PCR بیان miR-135b مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بیان miR-135b به میزان قابل توجهی در بافت اندومتر بیماران مبتلا به اندومتريوز در دو بافت اکتوپیک (Ectopic) و یوتوپیک (Eutopic) در مقایسه با زنان سالم، افزایش یافته بود؛ در حالی که بیان این microRNA در نمونه‌ی سرمی بیماران نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به تغییرات قابل توجه بیان در افراد اندومتريوز نسبت به نمونه‌های شاهد، در نمونه‌های بافت یوتوپیک و اکتوپیک و همچنین در نمونه‌های سرمی، احتمال می‌رود بتوان miR-135b را به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی و درمانی برای بیماری اندومتريوز به کار برد.

**واژگان کلیدی:** اندومتريوز، سرم، miR-135b

**ارجاع:** کلانتر سید مهدی، کرمی نورالدین، زارعی صادق، میرابوطالبی سید حمیدرضا، منتظری فاطمه، عبدیان اصل امیر، طالبی اندواری مهرداد. **miR-135b به**

**عنوان نشانگر زیستی تشخیصی در بیماران مبتلا به اندومتريوز.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۱): ۲۴۵-۲۴۱

با چرخه‌ی هورمونی تکثیر می‌یابند و حتی دچار خون‌ریزی دوره‌ای می‌شوند. فعالیت این ایمپلنت‌ها، منجر به اسکار داخلی دردناک، اختلال در عملکرد عضو مربوط و تشکیل چسبندگی‌های داخل بافتی می‌شود (۲).

اندومتريوز می‌تواند به دلایل مختلف نظیر هورمونی (۳)، ایمنولوژیک (۴)، آلودگی‌های محیطی و توکسین‌ها (۵)، ژنتیک (۶) و در نهایت، اپی‌ژنتیک به وجود آید. در کنار متیلاسیون DNA، تغییرات کووالان هیستون مانند استیلاسیون، متیلاسیون، یوبی کوئیتینه

## مقدمه

اندومتريوز، رشد بافت اندومتريوم در خارج از رحم (Ectopic) است و یکی از رایج‌ترین اختلالات مربوط به زنان و زایمان محسوب می‌شود. این بیماری، به طور تقریبی در ۱۰ درصد از تمامی زنان در سن باروری وجود دارد و شیوع آن در زنان نابارور ۵۰-۲۰ درصد افزایش پیدا می‌کند (۱). این سلول‌های اندومتريال به بافت‌های دیگر تهاجم و تکثیر می‌یابند تا ایمپلنت‌های اندومتريوزی را تشکیل دهند. این ایمپلنت‌ها، شبیه اندومتر طبیعی (Eutopic) هستند؛ به این معنا که

۱- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۴- دانشجوی دکتری، پژوهشکده‌ی ناباروری و تولید مثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سید حمیدرضا میرابوطالبی

Email: hr\_mirabutalebi@yahoo.com

۲۵ زن که مبتلا به اندومتريوز نبودند، اما به دلایل دیگری نظیر درد لگنی و بستن لوله‌ی فالوپ به بیمارستان مراجعه کرده و مورد جراحی قرار گرفته بودند، بافت اندومتر (یوتوپیک) و خون به عنوان نمونه‌ی شاهد گرفته شد.

معیارهای ورود به مطالعه‌ی حاضر شامل زنان با سن ۲۵-۴۰ سال با دوره‌ی قاعدگی منظم (۲۸-۳۲ روز) بود که در سه ماه قبل از نمونه‌گیری، هیچ داروی هورمونی دریافت نکرده بودند. سعی شد تمام نمونه‌های مورد و شاهد، در فاصله‌ی زمانی بین روزهای ۲۴-۱۹ دوره‌ی قاعدگی که مربوط به مرحله‌ی لوتئال می‌باشد، گرفته شد. میانگین سنی در زنان مبتلا به اندومتريوز  $2 \pm 32$  سال و همچنین، برای زنان سالم  $2 \pm 33$  سال بود. ۸ عدد از نمونه‌های بافتی به دلیل آلودگی با بافت‌های دیگر و عدم امکان جداسازی از مطالعه خارج شدند.

#### استخراج microRNA و سنتز DNA Complementary

(DNA): جهت استخراج RNA از کیت تجاری Trizol (Invitrogen, USA) استفاده شد. جهت بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ (Thermo 2000) و الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. سنتز cDNA برای microRNA به صورت دو مرحله‌ای انجام شد. در این آزمایش، از کیت سنتز cDNA سنتاز (شرکت بن‌یاخته، ایران) استفاده شد که در مرحله‌ی اول، به کمک آنزیم پلی‌A پلیمراز، تعداد زیادی نوکلئوتید A به انتهای RNAهای کوچک اضافه شد و در مرحله‌ی دوم، سنتز رشته‌ی اول cDNA بر اساس دستورالعمل اختصاصی کیت مورد نظر صورت گرفت.

**Real time PCR** بررسی بیان microRNA مورد مطالعه با روش PolyA reverse transcription-polymerase chain reaction (PolyA RT-PCR) با دستگاه (Applied Biosystem, USA) ABI انجام شد. توالی پرایمرهای Small nucleolar RNAs, C/D box (SNORD) و miR-135b (شرکت بن‌یاخته، ایران)، برای بررسی بیان ژن استفاده شد (جدول ۱). واکنش RT-qPCR مطابق جدول ۲ با حجم نهایی ۱۳ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. دماهای واکنش RT-qPCR بر طبق جدول ۳ انتخاب گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرها

ژن	توالی پرایمر
miR-135b	Forward: 5'- GTCACAGCGTATGGCTTGCTAA- 3'
SNORD	Forward: 5' ATCACTGTAACACCGTTCCA3

شدن، ریبوزیلاسیون، فسفوریلاسیون و ساموتیلاسیون و نیز RNA در رشته‌ای غیر کد شونده، به عنوان تغییرات اپی‌ژنتیک، می‌تواند سازمان‌دهی DNA و بیان ژنی را تنظیم کند (۷). microRNAها از جمله RNAهای غیر کد کننده محسوب می‌شوند که به طور معمول از ۲۵-۱۸ نوکلئوتید ساخته شده‌اند و به وسیله‌ی تجزیه یا مسدود کردن ترجمه‌ی mRNA هدف، بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. این مولکول‌ها، عمل خود را از طریق اتصال جفت بازی به ناحیه‌ی 3'UTR mRNA هدف انجام می‌دهند (۸).

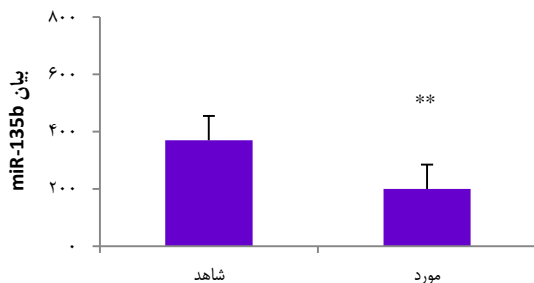
microRNAها نقش مهمی را در بیماری‌های متعدد پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی بازی می‌کنند. هر microRNA ترجمه‌ی بسیاری از ژن‌ها را به طور هم‌زمان کنترل می‌کند. با این حال، بر خلاف این حقیقت که microRNAها در پاتوژنز اندومتريوز از طریق تنظیم چندین رونوشت مرتبط با هیپوکسی، التهاب، آپوپتوزیس (Apoptosis)، ترمیم بافت، تکثیر سلولی، بازیابی ماتریکس خارج سلولی و آنژیوژنیز دخالته دارند، اما اطلاعات مربوط به miRNAهای گردش در خون و اندومتريوز محدود می‌باشد (۹-۱۲). miR-135 تعداد بسیاری هدف‌های پیش‌بینی شده شامل سلول عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن، Janus Kinase-2 و Phosphorylated mothers against decapentaplegic-5 را کنترل می‌کند (۱۳-۱۴).

بسیاری از هدف‌های miR-135 سرکوب کننده‌ی تومور هستند و نقش مهمی را در اندومتريوز مانند بسیاری از سرطان‌ها بازی می‌کند. miR-135b به صورت غیر طبیعی در اندومتريوم زنان مبتلا به اندومتريوز تنظیم می‌شوند که احتمال می‌رود افزایش miR-135b بیان ژن‌های نیازمند لانه‌گزینی را سرکوب می‌کند (۱۵). همچنین، در بسیاری از سرطان‌ها به خصوص در سرطان تخمدان نیز نقش دارند که یکی از اهداف اصلی آن، ژن HOXA10 می‌باشد (۹-۱۱). از این رو، هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان miR-135b در بافت‌های یوتوپیک و اکتوپیک و سرم افراد مبتلا به اندومتريوز بود تا با شناسایی تغییرات این microRNAها بتوان از آن‌ها در تشخیص و درمان استفاده نمود.

#### روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه‌های بیماران و افراد سالم:** از ۲۵ زن مبتلا به اندومتريوز مراجعه کننده به بیمارستان شهید صدوقی یزد که تحت عمل جراحی لاپاراسکوپی جهت درمان اندومتريوز قرار گرفته بودند، به صورت تصادفی و پس از گرفتن رضایت‌نامه‌ی آگاهانه، ۳ نمونه شامل بافت اکتوپیک (از بافت تخمدان) و یوتوپیک (از اندومتر داخل رحم) و نمونه‌ی خون، در هنگام عمل جراحی گرفته شد. همچنین، از

**نمونه‌ی سرم:** بیان miR-135b در سرم افراد گروه مورد نسبت به افراد گروه شاهد در شکل ۲ آمده است. میزان بیان miR-135b در سرم بیماران مبتلا به اندومتریوز (۲۵ نفر) نسبت به گروه شاهد (۲۵ نفر) کاهش معنی‌داری نشان داد.



شکل ۲. بیان miR-135b ( $2^{-\Delta Ct}$ ) در سرم نمونه‌های مورد (۲۵ نفر) در مقایسه با نمونه‌های شاهد (۲۵ نفر)  
\*\* $P < 0.01$

### بحث

در مطالعه‌ی حاضر، بیان miR-135b به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی-درمانی در اندومتریوز، در بافت اندومتر و سرم بیماران مبتلا به اندومتریوز اندازه‌گیری گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان miR-135b به میزان قابل توجهی در بافت اندومتر بیماران مبتلا به اندومتریوز در دو بافت اکوتیک و یوتوبیک در مقایسه با زنان سالم، افزایش دارد، در حالی که بیان این microRNA در نمونه‌ی سرمی بیماران نسبت به گروه شاهد کاهش می‌یابد. چالش اصلی برای توسعه‌ی ابزارهای درمانی و تشخیصی اندومتریوز، دانش کم ما از پاتولوژی این بیماری می‌باشد (۱۶). مطالعات متعددی نشان داده است که microRNA می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی قابل اعتماد تشخیصی-درمانی برای بیماری‌های متعدد انسانی استفاده شوند. microRNAها، نقش اساسی در پیشبرد یا متوقف کردن چرخه‌ی بیماری نظیر سرطان و سایر بیماری‌های پیش‌رونده دارد (۱۰). miR-135b به طور غیر محتملی تنظیم‌کننده‌ی شاخص ژن HOXA10 در این سلول‌ها شناخته شده است.

در مطالعات مختلف، بیان نابه‌جای miR-135b در تعدادی از سرطان‌ها نظیر سرطان کولورکتال، کارسینوم سلول‌های پوستی، آدنوکارسینوم مدول پانکراس و کارسینومای پایپلاری تیروئید دیده شده است. جالب است که نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان بیان miR-135b از لحاظ آماری به طور قابل توجهی در نمونه‌های اندومتر گروه مورد نسبت به گروه شاهد در هر دو بافت اکوتیک و یوتوبیک بیشتر است. اطلاعاتی از بیان بافتی خانواده‌ی miR-135 به خصوص miR-135b در بیماران اندومتریوز گزارش شده است که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد؛ با این تفاوت که در هیچ مطالعه‌ای،

جدول ۲. اجزای لازم برای واکنش Real-time PCR

(Real-time polymerase chain reaction) در دستگاه

نام محلول	مقدار (میکرولیتر)
Master syber	۶/۵۰
آب دیونیزه	۴/۲۵
پرایمر Forward	۰/۵۰
پرایمر Reverse universal	۰/۵۰
ROX	۰/۲۵
Template	۱/۰۰
حجم نهایی	۱۳

ROX: 6-Carboxyl-X-Rhodamine

**واکاوی آماری:** نتایج Real time PCR از طریق محاسبه‌ی

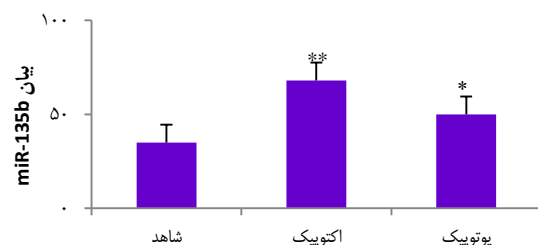
اختلاف میانگین  $2^{-\Delta Ct}$  به دست آمد. واکاوی آماری به منظور مقایسه‌ی میانگین بیان نسبی miR-135b در سه گروه (شاهد، یوتوبیک و اکوتیک) با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون One-way ANOVA و پس‌آزمون Tukey انجام شد. همچنین، برای نمونه‌های سرم از آزمون t استفاده گردید.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism رسم گردید.

جدول ۳. برنامه‌ی دمایی Real-time polymerase chain reaction برای microRNA (Real-time PCR)

دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	چرخه
۹۵	۱۲۰	۱
۹۵	۵	۴۰
۶۰	۳۰	۴۰

### یافته‌ها

**بافت اندومتر:** بیان miR-135b در بافت اندومتر بیماران نسبت به افراد سالم در شکل ۱ آمده است. میزان بیان miR-135b در گروه مورد (۱۷ نفر) نسبت به گروه شاهد (۱۷ نفر) افزایش بیان معنی‌داری نشان داد.



شکل ۱. بیان miR-135b ( $2^{-\Delta Ct}$ ) در بافت اندومتر گروه مورد (شامل اکتوبیک، یوتوبیک) (۱۷ نفر) در مقایسه با گروه شاهد (۱۷ نفر)  
\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

و رابطه‌ی تنظیمی بین بافت‌ها باشد که تا کنون اطلاعات زیادی در این مورد در دسترس نیست. این یافته‌ها، پیشنهاد می‌کند که miR-135b ممکن است در پاتوژنز اندومتريوزی از طریق تنظیم ژن‌های هدف آن‌ها درگیر باشد و همچنین، محصولات پروتئینی آن‌ها ممکن است به عنوان هدف‌های بالقوه برای کشف نشانگر زیتس استفاده شوند.

از این رو، پیشنهاد می‌شود در مطالعات پیش‌رو، در کنار بررسی بیان microRNAهای خانواده‌ی ۱۳۵ میزان بیان ژن‌های مرتبط و نیز ارتباط بیان microRNAهای در گردش (سرمی) و بافتی در هر دو بافت اکوتیک و یوتوتیک بررسی گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک با کد اخلاق IR.SSU.MEDICAL.REC.1396.168 مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد. بدین وسیله، نویسندگان از این دانشگاه و پژوهشکده‌ی تولید مثل و ناباروری یزد به خاطر حمایت مالی این مطالعه سپاسگزار می‌نمایند.

میزان بیان miR-135b در بافت اکوتیک بیماران اندومتريوز گزارش شده است.

بیان بالای این microRNA، باعث سرکوب ژن‌های نیازمند لانه‌گزینی می‌شود که ممکن است این عمل را با کاهش ژن‌های مرتبط با لانه‌گزینی نظیر HOXA10، Kinase-2، Janus و Phosphorylated mothers against decapentaplegic-5 صورت پذیرد (۱۷، ۱۵-۱۴). بنابراین، می‌توان گفت این تغییرات اپی‌ژنتیک در بافت اکوتیک، رشد غیر کنترل شده‌ی اندومتريوز، گسترش خارج رحمی و مهاجم بودن و شباهت آن به سرطان را تا حدودی توجیه می‌کند.

در مطالعه‌ی حاضر، از لحاظ آماری به طور چشم‌گیری بیان پایین miR-135b در سرم زنان دارای اندومتريوز در مقایسه با گروه شاهد دیده شد. هر چند منشأ دقیق این تغییرات در گردش خون، به طور مشخص واضح نیست. اگر چه مستندات پیشنهاد می‌کند که microRNAها ممکن است از بافت آزاد شده و به گردش خون ریخته شوند. غلظت microRNA در گردش خون بازتابی از سطح بیانی در بافت نمی‌باشد و احتمال دارد بیشتر وابسته به رابطه‌ی تنظیمی پیچیده بین microRNAها

### References

- Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955: 89-100.
- Mahmood TA, Templeton A. Prevalence and genesis of endometriosis. *Hum Reprod* 1991; 6(4): 544-9.
- Gurates B, Bulun SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Semin Reprod Med* 2003; 21(2): 125-34.
- Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50(1): 48-59.
- Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 21(4): 433-41.
- Simpson JL, Bischoff FZ, Kamat A, Buster JE, Carson SA. Genetics of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30(1): 21-40.
- Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; 14(14): R546-R551.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50(4): 298-301.
- Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update* 2010; 16(2): 142-65.
- Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, et al. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 2009; 4(5): e5532.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13(4): 423-33.
- Nagel R, le SC, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, et al. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68(14): 5795-802.
- Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, Gel B, et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009; 114(14): 2945-51.
- Petracco R, Grechukhina O, Popkhadze S, Massasa E, Zhou Y, Taylor HS. MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(12): E1925-E1933.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14(4): 422-69.
- Cho S, Mutlu L, Grechukhina O, Taylor HS. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertil Steril* 2015; 103(5): 1252-60.



## miR-135b as a Diagnostic Biomarker in Patients with Endometriosis

Seyed Mehdi Kalantar<sup>1</sup>, Noorodin Karami<sup>2</sup>, Sadegh Zarei<sup>3</sup>, Seyed Hamidreza Mirabutalebi<sup>2</sup>,  
Fatemeh Montazeri<sup>4</sup>, Amir Abdian-Asl<sup>5</sup>, Mehrdad Talebi-Andavari<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Endometriosis is an estrogen-dependent disorder in which endometrial cells that are in the normal state of the uterus are seen outside the uterus. The disease is one of the most common and costly diseases in women with an estimated 176 million female infections in the world and a financial burden of about 11 billion dollars per year. In addition to existing therapies, the use of epigenetic factors, and in particular, assessment of the expression of microRNAs is effective in the diagnosis and treatment of the disease. The aim of this study was to evaluate the expression of miR-135b in endometriosis, so that through identifying changes in these microRNAs, it could be used in diagnosis and treatment.

**Methods:** From 25 cases with endometriosis and 25 healthy subjects (control) tissue and serum samples were taken. First, RNA extraction was performed and then, using the polyA reverse transcription-polymerase chain reaction (polyA RT-PCR) and real-time polymerase chain reaction, miR-135b expression was investigated.

**Findings:** The expression of mir-135b significantly increased in endometrial tissue of patients with endometriosis in both ectopic and uterine tissues compared to healthy women; while the expression of this microRNA in the serum samples of patients decreased compared to control group.

**Conclusion:** Considering significant changes in both eutopic/ectopic samples and serum samples in patients with endometriosis compared with controls, miR-135b may be considered as a diagnostic and therapeutic biomarker for endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis, Serum, miR-135b

**Citation:** Kalantar SM, Karami N, Zarei S, Mirabutalebi SH, Montazeri F, Abdian-Asl A, et al. **miR-135b as a Diagnostic Biomarker in Patients with Endometriosis.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(471): 241-5.

1- Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran  
2- MSc Student, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran  
3- PhD Student, Department of Biochemistry, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran  
4- PhD Student, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran  
5- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran  
**Corresponding Author:** Seyed Hamidreza Mirabutalebi, Email: mirabutalebi93@gmail.com

## *Editorial Board (In alphabetical order)*

1. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada; khosrow.adeli@sickkids.ca
2. **Ali Akhavan** MD, Assistant Professor of Radiation Oncology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran ali52akhavan@yahoo.com
3. **Mohammadreza Akhlaghi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; akhlaghi@med.mui.ac.ir
4. **Reza Amin** MD, Professor of Pediatrics, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran; aminr@sums.ac.ir
5. **Babak Amra** MD, Professor of Pulmonology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran amra@med.mui.ac.ir
6. **Saeed A. Jortani** PhD, Professor of Pathology, University of Louisville, Louisville, KY, USA; sajort01@louisville.edu
7. **Reza Bagherian-Sararoudi** PhD, Associate Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; bagherian@med.mui.ac.ir
8. **Majid Barekatin** MD, Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran barekatin@med.mui.ac.ir
9. **Ken Bassett** MD, PhD, Professor of Therapeutics Initiative, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; bassett@chspr.ubc.ca
10. **Ahmad Chitsaz** MD, Professor of Neurology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; chitsaz@med.mui.ac.ir
11. **Afsoon Emami-Naini** MD, Associate Professor of Nephrology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; af\_emami@med.mui.ac.ir
12. **Shahin Emami** Department of Biochemistry, Saint Antoine Hospital, Paris, France; shahin.emami@cgc.edu
13. **Ebrahim Esfandiary** MD, PhD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; esfandiari@med.mui.ac.ir
14. **Ahmad Esmailzadeh** PhD, Professor of Nutrition, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; esmaillzadeh@hlth.mui.ac.ir
15. **Ziba Farajzadegan** MD, Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; farajzadegan@med.mui.ac.ir
16. **Aziz Ghahary** MD, Professor Plastic Surgery, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; aziz.ghahary@ubc.ca
17. **Jafar Golshahi** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; golshahi@med.mui.ac.ir
18. **Mostafa Hashemi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; mostafahashemi60@gmail.com
19. **Saied Morteza Heidari** MD, Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; m\_heidari@med.mui.ac.ir
20. **Ali Hekmatnia** MD, Professor of Radiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; hekmatnia@med.mui.ac.ir
21. **Fariba Iraj** MD, Professor of Dermatology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; iraji@med.mui.ac.ir
22. **Faramarz Ismail-Beigi** MD, PhD, Professor of Endocrinology, University Hospitals Cleveland Medical Center, Cleveland, OH, USA; faramarz.ismail-beigi@case.edu
23. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; kelishadi@med.mui.ac.ir
24. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics and Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; khani@med.mui.ac.ir
25. **Majid Kheirollahi** PhD, Associate Professor of Genetics and Molecular Biology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; mkheirollahi@med.mui.ac.ir
26. **Parvin Mahzouni** MD, Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; mahzouni@med.mui.ac.ir
27. **Marjan Mansourian** PhD, Assistant Professor of Epidemiology and Biostatistics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; j\_mansourian@hlth.mui.ac.ir
28. **Mohammad Mardani** MD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; mardani@med.mui.ac.ir
29. **Mehdi Modarres-Zadeh** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; mmodarres51@yahoo.com
30. **Etie Moghisi** MD, Associate Professor of Endocrinology, Marina Diabetes and Endocrinology Center, Marina del Rey, CA, USA; emoghissi@gmail.com
31. **Mohammadreza Nourbakhsh** PhD, Professor of Physiotherapy, North Georgia College, Dahlonega, GA, USA; reza.nourbakhsh@ung.edu
32. **Farzin Pourfarzad** PhD, Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands; f.pourfarzad@erasmusmc.nl
33. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; m\_pourmoghadas@med.mui.ac.ir
34. **Maryam Radahmadi** PhD, Assistant Professor of Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; m\_radahmadi@med.mui.ac.ir
35. **Hassan Razmj** MD, Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; razmj@med.mui.ac.ir
36. **Reza Rouzbahani** MD, Assistant Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; rouzbahani@med.mui.ac.ir
37. **Masih Saboori** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; saboori@edc.mui.ac.ir
38. **Mohammad Reza Safavi** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; safavi@med.mui.ac.ir
39. **Rasoul Salehi** PhD, Assistant Professor of Genetics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; r\_salehi@med.mui.ac.ir
40. **Mansour Sholevar** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; sholevar@med.mui.ac.ir
41. **Mohammadreza Sharifi** MD, PhD, Professor of Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; sharifi@med.mui.ac.ir
42. **Masoud Soheilian** MD, Professor of Ophthalmology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; masoud\_soheilian@yahoo.com





## JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 36, No. 471, 3<sup>rd</sup> Week May 2018

Isfahan University of Medical Sciences

Chairman: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

Associate Editor: **Maryam Radahmadi PhD**

---

### Owner:

Isfahan University of Medical Sciences  
Email: [publications@mui.ac.ir](mailto:publications@mui.ac.ir)

### Office:

P.O. Box 81744-176, Isfahan, Iran  
Tel/fax: +98 31 37922291  
Email: [jims@med.mui.ac.ir](mailto:jims@med.mui.ac.ir)  
Website: <http://jims.mui.ac.ir>

Executive Manager: Ali Moradi, Office Secretary: Golnaz Rajabi

### Publisher:

Vesnu Publications

Email: [farapublications@gmail.com](mailto:farapublications@gmail.com)  
<http://farapub.com>

Tel/fax: +98 31 32224382  
Circulation: 500

---

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

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