دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

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

سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/ هفته اول اردیبهشت ۱۳۹۴ **هفته‌نامه**

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

Weekly Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015

مقاله‌های پژوهشی

تولید پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) و بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی سینه ... ۲۲۱
فرشته قندهاری، دکتر ماندانا بهبهانی، دکتر عباسعلی پورآذر، دکتر زهرا نورمحمدی

شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا ۲۳۱
علی عینلو، دکتر پروین دهقان، دکتر مجتبی صلوتی، دکتر سینا میرزااحمدی

بررسی نگرش پزشکان جامعه درباره‌ی اخلاق پزشکی ۲۴۲
دکتر قدرت اله مومنی، دکتر ندا یاوری، مریم قاسمی

بیان miR-148a در تومورهای منژیومای انسانی ۲۵۲
مهدیه مودی، دکتر مجید خیراللهی

مقاله کوتاه

مقایسه‌ی سه روش مختلف اندازه‌گیری HbA1c با روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۲۵۸
دکتر آذر برادران، دکتر آزاده کرمی

Original Articles

Producing Vesicular Stomatitis Virus G (VSVG) Protein and Assessment of its Cytotoxic Activity against Breast Cancer Cells 230
Fereshteh Ghandehari MSc, Mandana Behbahani PhD, Abbasali Pourazar PhD, Zahra Nourmohammadi PhD

Specific Identification of Candida Glabrata via Colorimetric Assay Based on Gold Nanoparticles ... 241
Ali Einloo, Parvin Dehghan PhD, Mojtaba Saluti PhD, Sina Mirzaahmadi PhD

Evaluation of Physicians' Attitude about Medical Ethics 251
Ghodratollah Momeni PhD, Neda Yavari MD, Maryam Ghasemi

Expression of miR-148a in Human Meningioma Tumors 257
Mahdiyeh Moodi MSc, Majid Kheirollahi PhD

Short Communication

Comparing Three Methods of HbA1c Measurement with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 266
Azar Baradaran MD, Azadeh Karami MD

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۲۵)، هفته اول اردیبهشت ۱۳۹۴

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

ناشر:
انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
E-mail: publications@mui.ac.ir
دفتر مجله: دانشکده پزشکی صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶
مسؤول دفتر: گلناز رجبی
تلفن: ۳۶۶۹۴۷۳۷-۰۳۱ **دورنگار:** ۳۷۹۲۲۲۹۱-۰۳۱
E-mail: jims@med.mui.ac.ir
وب سایت مجله: http://www.journals.mui.ac.ir/jims

امور نشر:
(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)
شرکت فرزانگان راداندیش
اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵
تلفن و دورنگار: ۳۶۶۸۶۳۰۲-۰۳۱

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

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

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

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

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

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

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

راهنمای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱- **اهداف و چشم انداز:** مجله دانشکده پزشکی اصفهان به صورت هفته‌نامه و تحت حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتشر می‌گردد.

۲- این مجله مقالات اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را منتشر می‌نماید و همچنین فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین را بر روی وب سایت مجله قرار می‌دهد.

۳- **پذیرش دست‌نوشته:** پذیرش دست نوشته‌ها و پیگیری‌های بعدی در این مجله فقط از طریق وب سایت اختصاصی آن به آدرس http://www.journals.mui.ac.ir/jims و پس از ثبت نام (Registration) در آن ممکن می‌باشد. همراه دست نوشته باید یک نامه تایپ شده (Covering letter) به سردبیر، شامل عنوان و اسامی نویسنده یا نویسندگان و اعلام این که این دست نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است و یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد، ارسال گردد.

۴- دست‌نوشته باید توسط نرم‌افزار MS Word در سایز A_4 و فاصله خطوط دو برابر (Double Spaced) با حاشیه‌های ۲/۵ سانتی‌متری تهیه شوند. جداول بدون حاشیه خارجی و تصاویر در فرمت GIF و JPEG و در تعداد محدود باشند. ارسال مدارک با فرمت PDF به هیچ عنوان پذیرفته نیست.

۵- دست نوشته باید شامل صفحه عنوان، چکیده، مقدمه ، روش‌ها، یافته‌ها، بحث، تقدیر و تشکر و منابع باشد.
صفحه عنوان: این صفحه بایدشامل عنوان کامل،عنوان مکرری، اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان و همچنین آدرس، تلفن، فاکس و پست الکترونیکی نویسنده مسؤول باشد. ذکر منابع مالی و اعتباری طرح پژوهشی در این صفحه ضروری است.

۶- **چکیده:** تمام مقالات اصلی باید دارای چکیده مقاله به دو زبان فارسی و انگلیسی با حداکثر ۲۵۰ کلمه باشد. چکیده باید شامل بخش‌های سابقه علمی موضوع، روش‌ها، یافته‌ها و بحث باشد. در پایان چکیده مقاله ۵-۳ کلمه کلیدی قرار می‌گیرد که تنها با استفاده از راهنمای MESH در آدرس (http://nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html) استخراج گردند.

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

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

۹- **یافته‌ها:** این بخش به صورت متن همراه با جدول‌ها، شکل‌ها و نمودارها ارائه می‌گردد. محتوای جداول نباید به صورت کامل در متن ارائه شوند، بلکه کافی است با ذکر شماره جدول، شکل و یا نمودار به آنها اشاره شود. جدول‌ها، نمودارها و شکل‌ها هر کدام باید در یک صفحه جداگانه و پس از منابع، در پایان دست‌نوشته آورده شوند. در این بخش فقط یافته‌ها ارائه می‌شود و باید از ذکر دلایل و استدلال‌های مرتبط با آن خودداری گردد.

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

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

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

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

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

اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

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

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

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

اگر منبع مورد نظر کتاب است:

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

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

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

اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

۲۳- **فرآیند مرور دقیق (Peer Review):** تمام دست‌نوشته‌ها توسط حداقل ۳ نفر از داوران منتخب شورای نویسندگان مجله مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. نویسنده‌ی مسؤول در کوتاه‌ترین زمان در جریان تصمیم سردبیر در مورد رد، قبول یا اصلاحات مورد نظر داوران و هیأت تحریریه قرار خواهد گرفت. در صورت پذیرش مقاله برای چاپ، نامه پذیرش به همراه ایمیل برای نویسنده‌ی مسؤول ارسال می‌شود و مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت.

۲۴- هیأت تحریریه در رد، اصلاح، ویرایش و خلاصه کردن مقاله آزاد است.

۲۵- مسؤولیت صحت یا سقم مطالب ارائه شده در مقاله بر عهده‌ی نویسنده یا نویسندگان است.

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

تولید پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) و بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی سینه..... ۲۲۱

فرشته قندهاری، دکتر ماندانا بهبهانی، دکتر عباسعلی پورآذر، دکتر زهرا نورمحمدی

شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا..... ۲۳۱

علی عینلو، دکتر پروین دهقان، دکتر مجتبی صلوتی، دکتر سینا میرزااحمدی

بررسی نگرش پزشکان جامعه درباره‌ی اخلاق پزشکی..... ۲۴۲

دکتر قدرت اله مومنی، دکتر ندا یاوری، مریم قاسمی

بیان miR-148a در تومورهای منتژیومای انسانی..... ۲۵۲

مهدیه مودی، دکتر مجید خیراللهی

مقاله کوتاه

مقایسه‌ی سه روش مختلف اندازه‌گیری HbA1c با روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)..... ۲۵۸

دکتر آذر برادران، دکتر آزاده کرمی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۵

تولید پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) و بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی سینه

فرشته قندهاری[۱]، دکتر ماندانا بهبهانی[۲]، دکتر عباسعلی پورآذر[۳]، دکتر زهرا نورمحمدی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (Vesicular stomatitis virus G یا VSVG) یک گلیکوپروتئین غشایی است که در اتصال ویروس به گیرنده‌های اختصاصی در سطح سلول دخالت دارد. این پروتئین به طور وسیع در مطالعات ژن درمانی استفاده می‌شود. با این حال، یکی از محدودیت‌های عمده‌ی استفاده از آن در ژن درمانی، توکسیک بودن در غلظت‌های بالا برای سلول‌های انسانی است.

روش‌ها: با انجام ترانسفکشن، پروتئین VSVG تولید و سپس فعالیت سایتوتوکسیک پروتئین با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و بررسی تغییرات مرفولوژیک بر روی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7 و MDA-MB-231) و سلول طبیعی کلیه‌ی انسانی (HEK-293) بررسی گردید.

یافته‌ها: با افزایش غلظت سمیت سلولی، پروتئین VSVG بر روی سلول‌های سرطانی افزایش یافت و بین اثر سمیت این پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB-231 تفاوت آماری معنی‌دار وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$). در حالی که بین اثر آن بر روی سلول‌های سرطانی و طبیعی HEK تفاوت آماری معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). همچنین، نتایج حاصل از بررسی تغییرات مرفولوژیک، چروکیدگی و تغییر شکل در غشای سلول‌های سرطانی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: از آن جایی که پروتئین VSVG فقط در غلظت‌های بالا برای سلول‌های طبیعی دارای خاصیت سمی است، به نظر می‌رسد که با مطالعات بیشتر بر روی این پروتئین بتوان از آن به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ویروس وزیکولار استوماتیتیس، ژن درمانی، سایتوتوکسیک، ترانسفکشن

ارجاع: قندهاری فرشته، بهبهانی ماندانا، پورآذر عباسعلی، نورمحمدی زهرا. **تولید پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) و بررسی اثرات سایتوتوکسیک آن بر سلول‌های سرطانی سینه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۳۰-۲۲۱

مقدمه

نوع سلول‌هایی که توسط ویروس آلوده می‌شوند، به پروتئین پوشش ویروس وابسته است. ناقل‌های ویروسی که حاوی پوشش یک ویروس دیگر باشند، ویروس کاذب نامیده می‌شوند. این ناقل‌های ویروسی تنها قادر به آلوده کردن سلول‌هایی هستند که دارای گیرنده برای این پروتئین پوشش جدید است. بنابراین، دامنه‌ی عفونت‌زایی ویروس به این پوشش

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- استادیار، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه ایمنولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرشته قندهاری
Email: ghandehari@iaufala.ac.ir

جدید وابسته است (۱).

از پوشش‌های پروتئینی ویروس‌های مختلف، برای تولید ناقل‌های ویروسی کاذب استفاده شده است (۲). گلیکوپروتئین پوشش ویروس وزیکولار استوماتیتیس (Vesicular stomatitis virus G یا VSVG) یکی از پروتئین‌های پوششی است که جهت تولید ناقل‌های ویروسی، به ویژه ناقل‌های رتروویروسی و لنتی‌ویروسی کاذب مورد استفاده قرار گرفته است.

یکی از کاربردهای مهم ناقل‌های ویروسی کاذب، در ژن درمانی است. از آن جایی که، این ناقل‌ها می‌توانند به محدوده‌ی وسیعی از انواع سلول‌ها وارد شوند، بنابراین می‌توان با استفاده از این پوشش در ناقل‌های ویروسی کاذب، این امکان را فراهم نمود که ناقل‌های ویروسی به سلول‌های مختلف که در ژن‌تراپی و انتقال ژن نیاز است، متصل شوند. ویروس‌های کاذب دارای این گلیکوپروتئین، به علت بر هم‌کنش با فسفر لیپیدهای غشای میزبانی، گستره و طیف میزبانی وسیعی دارند (۳).

پروتئین G وزیگولار استوماتیتیس با طولی حاوی ۵۱۱ آمینواسید و وزن مولکولی ۶۵ هزار دالتون، از خانواده رابدو ویروس‌ها می‌باشد. قسمت عمده‌ای از این پروتئین در خارج از غشای ویروس قرار گرفته است و به عنوان اکتودومین در پروتئین معرفی می‌شود (۴). پروتئین G دارای حداقل سه شکل فرضی مختلف است که خصوصیات بیوفیزیکی و بیوشیمیایی متفاوتی دارد؛ حالت Pre-fusion (طبیعی) که در pH بالای ۷ مشاهده می‌شود، حالت هیدروفوبیک فعال که با غشای هدف به عنوان اولین مرحله از پروسه فیوژن واکنش می‌دهد و حالت Post-fusion که از نظر ساختاری، متفاوت از دو حالت قبلی است. یک موازنه‌ی وابسته به pH بین اشکال مختلف پروتئین G وجود دارد؛ به صورتی که در pH پایین، پروتئین G به سمت ساختار Post-fusion هدایت می‌شود. این تغییر شکلی ناشی از pH پایین، قابل برگشت است (۵).

گزارش‌های زیادی مبنی بر توکسیک بودن این پروتئین بر روی سلول‌های انسانی عنوان شده است و این امر می‌تواند مشکلاتی را هنگام تهیه‌ی ناقل‌های کاذب سبب شود. Yu و همکاران نشان دادند که ناقل‌های رتروویروسی بر پایه‌ی HIV-I () با پوشش VSVG دارای کارآیی بالا جهت انتقال ژن به بافت‌های عروقی می‌باشند (۶). Miyanohara نیز در مطالعه‌ای نشان داده است که استفاده از VSVG به تنهایی در حد مطلوبی می‌تواند به‌عنوان یک ناقل مناسب برای انتقال ژن باشد و این در حالی است که استفاده‌ی بیش از حد مطلوب از آن، سایتوتوکسیک است (۷). در یک بررسی نیز پیشنهاد شده است که پروتئین VSVG به‌عنوان یک پروتئین، پوششی مناسب برای ساخت ناقل‌های ویروسی کاذب است و همچنین، این پروتئین به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی معرفی شده است (۸).

تا زمان انجام این مطالعه، هیچ پژوهشی به صورت آزمایشگاهی بر روی اثرات توکسیک پروتئین VSVG گزارش نشده بود. در این پژوهش، پروتئین G تولید و خصوصیت سایتوتوکسیک آن بر روی سلول‌های سرطانی سینه در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

روش‌ها

استخراج پلاسمید: در این پژوهش، از پلاسمید pMD2-G جهت تولید پروتئین VSVG استفاده شد. این پلاسمید دارای ژن گلیکوپروتئین VSVG و پروموتور سایتومگالوویروس و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک است. اندازه و تعداد جفت باز این پلاسمید بر اساس نقشه‌ی ژنومی ۵۸۲۴ جفت باز می‌باشد. جهت بیان ژن VSVG، از سلول‌های یوکاریوت HEK 293T استفاده شد. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است که به‌عنوان ژن گزارشگر انتخابی استفاده می‌شود.

باکتری Escherichia coli DH 5a حاوی پلاسمید مذکور از شرکت Addgene کشور آمریکا خریداری گردید. کشت ۲۴ ساعته‌ی سویه‌ی باکتری حاوی پلاسمید در محیط Luria-Bertani جهت استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت Roche آلمان و روش لیز قلیایی انجام گرفت. مشاهده‌ی باند الکتروفورز بر روی ژل اگارز یک درصد و متعاقب آن، رنگ‌آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید انجام شد. با مقایسه‌ی اندازه‌ی باند استخراج شده با نشانگر ده کیلوبازی، صحت استخراج پلاسمید اثبات شد. غلظت پلاسمید استخراج شده با کیت و روش لیز قلیایی با استفاده از اسپکت NanoDrop بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر محاسبه شد.

ترانسفکشن و تولید پروتئین VSVG: یک تا دو روز قبل از انجام ترانسفکشن، $۱۰^۴ \times ۵$ سلول HEK293T در دو چاهک از ظرف شش خانه کشت داده شد. زمان لازم برای انجام ترانسفکشن وقتی بود که کشت سلولی تک لایه به تراکم سطحی بیشتر از ۷۰ درصد رسید. یک ساعت قبل از شروع ترانسفکشن، محیط رویی چاهک‌ها خارج و محیط تازه‌ی حاوی گلوتامین و سرم اضافه شد. فرایند ترانسفکشن به منظور تولید پروتئین VSVG با استفاده از کیت Polyfect Transfection (شرکت Roche آلمان) مطابق دستورالعمل کیت انجام و عمل تغلیظ با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول و اولتراسانتریفوژ صورت گرفت. برای اثبات پروتئین، از الکتروفورز سدیم ۲- دسیل پلی‌آکریل امید استفاده شد و باند مشاهده شده با نشانگر پروتئینی ۲۰۰ کیلودالتونی از شرکت Fermentas کشور آمریکا مقایسه شد. همچنین، با استفاده از تکنیک ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) و اندازه‌گیری جذب نوری، وجود و مقدار پروتئین در نمونه‌ی بعد از ترانسفکشن اثبات گردید.

تغلیظ پروتئین با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول و اولتراسانتریفوژ: ۴۸ ساعت بعد از انجام ترانسفکشن، محیط رویی حاوی پروتئین از روی سلول‌ها جمع‌آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. این عمل جهت جداسازی ضایعات سلولی شناور در محیط انجام گرفت. به مایع رویی، ۲ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن گلیکول ۸ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه، بر روی یخ قرار داده شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۱۵۰۰، سانتریفوژ انجام شد.

در مرحله‌ی بعد، ۲ میلی‌لیتر از مایع زیری دور ریخته شد و به باقی‌مانده، ۴ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن گلیگول ۱۶ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید و بعد از قرار دادن بر روی یخ، سانتریفوژ انجام شد. در پایان، ۴ میلی‌لیتر از مایع زیری دور ریخته شد و به باقی‌مانده، ۶ میلی‌لیتر محلول پلی‌اتیلن

گلیکول ۲۴ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید و بار دیگر، بعد از قرار دادن بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه، سانتریفوژ انجام شد. ۴ میلی‌لیتر از مایع زیری دور ریخته شد و باقی‌مانده جمع آوری و در دور g ۸۰۰۰۰ اولتراسانتریفوژ شد. پس از اولتراسانتریفوژ، رسوب جمع آوری و محلول رویی دور ریخته شد.

تکنیک ELISA مستقیم: نمونه‌ی حاوی پروتئین توسط بافر پوشش دهنده‌ی رقیق به میزان ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، به چاهک‌ها در میکروپلیت انتقال داده شد. سپس، پلیت توسط یک پلاستیک پوشانده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد؛ با استفاده از بافر شستشو سه بار شستشو گردید و ۲۰۰ میکرولیتر بافر توقف به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و بار دیگر، با استفاده از بافر شستشو، سه بار شستشو داده شد.

سپس، آنتی‌بادی کونژوکه Goat Anti-VSVG IgG Antibody به صورت (Horseradish peroxidase) HRP با بافر مسدود کننده، رقیق شد و به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی اضافه و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. بار دیگر، چاهک‌ها توسط ۲۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو دهنده، شستشو داده شد.

در نهایت، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از معرف ترامتیل بنزیدین (TMB یا Tetramethylbenzidine) اضافه شد تا رنگ گسترش یابد و بعد از ۱۰ دقیقه، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بافر توقف اضافه گردید. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه ELISA reader خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پروتئین محاسبه گردید.

کشت سلول‌ها: فلاسک‌های حاوی رده‌های سلولی سرطانی MCF7,MDA-MB231 و سلول طبیعی HEK293 مورد استفاده در پژوهش، از انستیتو پاستور ایران دریافت گردید. این سلول‌ها به صورت تک لایه رشد کرده، کف فلاسک را پر می‌کنند و در این حالت نیاز است که سلول‌ها واکشت شوند. جهت انجام پاساژ، از محیط کشت RPMI1640 (Merck آلمان) با مکمل ۱۰درصد سرم آلبومین گاوی، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲ میکرومول از گلوتامین استفاده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن، انکوبه گردید. تمام مراحل در زیر هود لامینار انجام گرفت.

ارزیابی میزان سایتوتوکسیسیتی: برای انجام آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]، ابتدا تعداد ۵۰۰۰۰ از سلول‌های مورد نظر در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ چاهکی و در ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) کشت داده شد. پس از اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک‌ها، ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پروتئین اضافه گردید. سه چاهک حاوی محیط و سلول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور حاوی دی‌اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و پس از طی این مدت، در تاریکی

۲۰ میکرولیتر، محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید و پلیت بار دیگر برای دو ساعت به انکوباتور برگردانده شد. سپس، محیط روی سلول‌ها خارج و به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide)، ساخت شرکت Merck آلمان، جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان افزوده و پیتاژ شد.

جذب نوری غلظت‌ها با استفاده از ELISA reader (شرکت Awareness آمریکا) در طول موج ۶۳۰-۴۹۲ نانومتر خوانده شد. درصد بقای سلول‌ها، که تحت تأثیر غلظت خاصی از پروتئین قرار گرفته باشند، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد بقا = (جذب بلانک - جذب کنترل/جذب بلانک - جذب سلول تیمار شده) × ۱۰۰

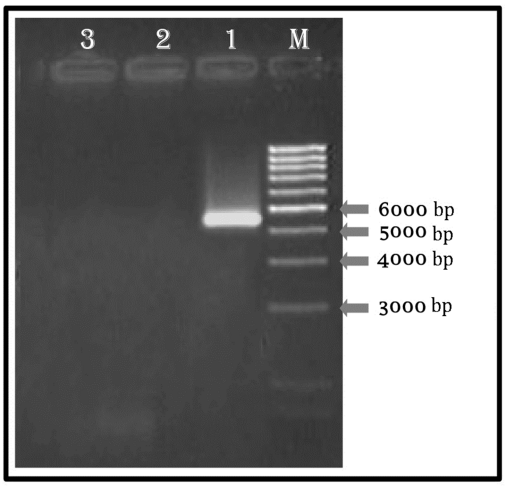
همچنین، CC50 (50% cytostatic concentration) یا غلظتی از پروتئین که بتواند ۵۰ درصد از سلول‌ها را از بین ببرد) پس از رسم نمودار Regression خطی تعیین شد.

بررسی تغییرات مرفولوژیک در سلول‌های تیمار شده: سه فلاسک حاوی 10^5 سلول، در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت، که از اتصال سلول‌ها اطمینان حاصل شد، غلظت CC50 از پروتئین (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به طور جداگانه اضافه و پس از۴۸ ساعت، تغییرات ایجاد شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس در بزرگ‌نمایی ۲۰ مشاهده و عکس برداری شد.

نتایج و داده‌های به دست آمده از انجام مطالعات، به صورت میانگینی از سه تکرار مختلف گزارش گردید. نتایج به دست آمده، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تحلیل آماری قرار گرفت. در تحلیل آماری، نتایج اثرات غلظت‌های مختلف پروتئین بر رده‌های سلولی با یکدیگر مقایسه شد. برای مشخص شدن این امر، که بین گروه‌های مطالعاتی تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد یا خیر، از آزمون ANOVA (دانکن و Repeated Measure) در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ استفاده گردید. نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه‌ی ۲۰۱۲ (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA) ترسیم شد.

یافته‌ها

مقایسه‌ی باند حاصل از استخراج پلاسمید با نشانگر ۱۰ کیلو جفت بازی، صحت استخراج پلاسمید را نشان داد (شکل ۱).

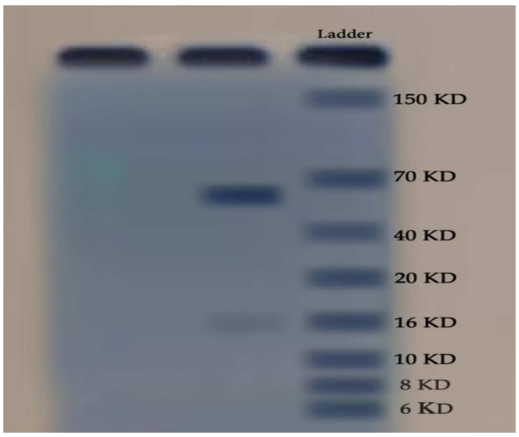


شکل ۱. مقایسه‌ی باند پلاسمید استخراج شده با نشانگر ۱۰ کیلو جفت بازی

همچنین، غلظت پلاسمید استخراج شده با دو روش لیز قلیایی و کیت به ترتیب برابر ۰/۳۲ و ۵/۳ میکروگرم در میکرولیتر بود که حاکی از

مناسب‌تر بودن روش استخراج پلاسمید با استفاده از کیت نسبت به روش لیز قلیایی می‌باشد.

به دنبال ترانسفکشن و تولید پروتئین VSVG، با مقایسه‌ی باند حاصل با نشانگر ۲۰۰ کیلودالتونی، وجود پروتئین در نمونه اثبات گردید (شکل ۲).

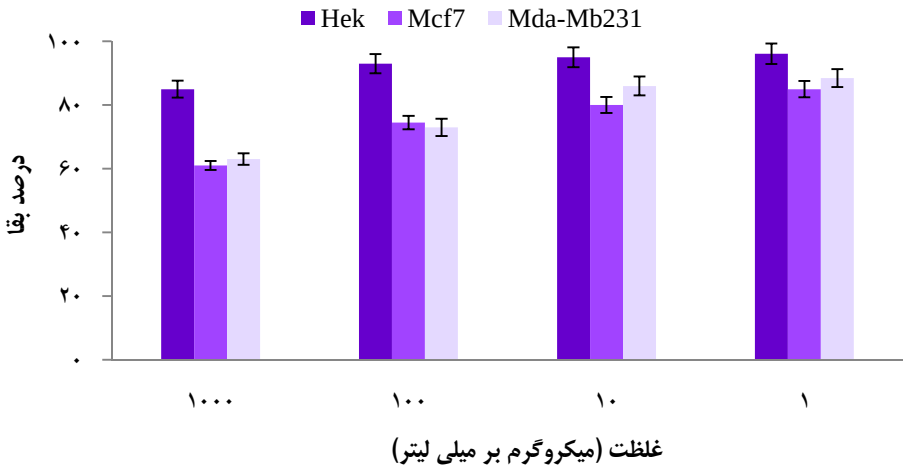


شکل ۲. مقایسه‌ی باند پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) با نشانگر پروتئین ۱۰۰ کیلودالتونی

نتایج حاصل از بررسی سمیت پروتئین بر روی رده‌های سلولی ذکر شده در غلظت‌های مختلف، در نمودار ۱ آورده شده است.

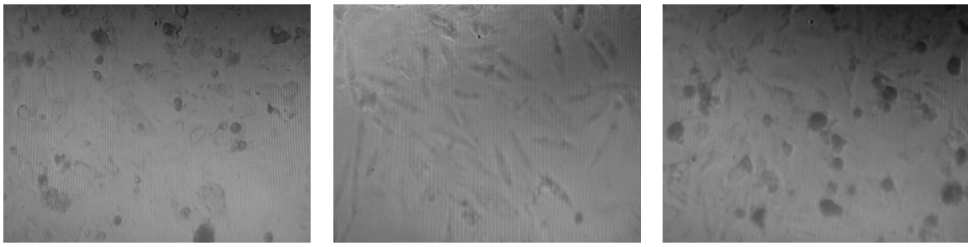
مقایسه‌ی میانگین‌ها نیز نشان داد که با افزایش غلظت سمیت سلولی، این پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. این در حالی است که پروتئین بر روی سلول‌های طبیعی، فقط در غلظت ۱۰۰۰ توانست حدود ۱۵ درصد رشد سلول را کاهش دهد. همچنین، نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که بین اثر سمیت این پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی MCF7 و MDA-MB231، تفاوت آماری معنی‌داری وجود ندارد؛ در حالی که، بین اثر آن بر روی سلول‌های سرطانی و طبیعی HEK، تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات مرفولوژیک نیز نشانگر چروکیدگی و تغییر شکل در غشای سلول‌ها، به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های CC50 از پروتئین VSVG بود (شکل ۳).

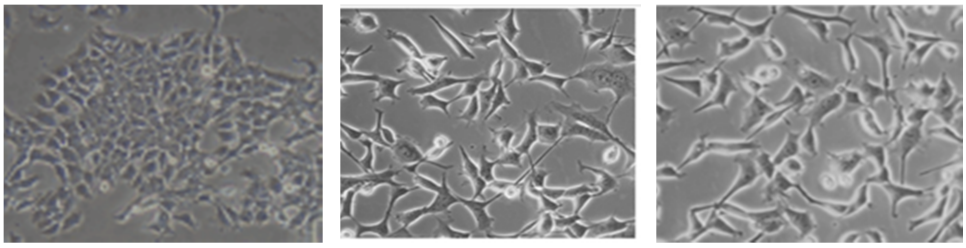


نمودار ۱. درصد بقای سلول‌های تیمار شده با پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG)

هر نقطه روی نمودار، میانگین سه بار تکرار است. Error bar بیانگر میانگین ± انحراف معیار است. با افزایش غلظت پروتئین، سمیت آن بر سلول‌های سرطانی افزایش یافت؛ در حالی که، پروتئین بر روی سلول طبیعی HEK اثر چندانی نشان نداد و فقط در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، حدود ۱۵ درصد رشد سلول‌ها را کاهش داد.



سلول سرطانی MDA-MB231 بعد از تیمار | سلول سرطانی MDA-MB231 | سلول سرطانی MCF7 بعد از تیمار



سلول طبیعی (HEK) بعد از تیمار | سلول طبیعی (HEK) قبل از تیمار | سلول سرطانی MCF7 قبل از تیمار

شکل ۳. تغییرات مرفولوژیک در سلول‌های سرطانی و طبیعی (HEK) قبل و بعد از تیمار با پروتئین G ویروس وزیکولار استوماتیتیس (VSVG) با بزرگ‌نمایی ۲۰ ×

در سلول‌های سرطانی، بعداز تیمار با غلظت‌های CC50، چروکیدگی و تغییر شکل در سلول‌ها مشاهده شد؛ در حالی که، در سلول طبیعی (HEK) تغییری دیده نشد.

بحث

نتایج حاصل از بررسی اثرات سایتوتوکسیک پروتئین VSVG بر روی سلول‌های سرطانی سینه (MCF7-MDA-MB231) در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که این پروتئین دارای خاصیت توکسیک بوده، بقای سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد. همچنین، یافته‌ها نشان می‌دهد که پروتئین بر روی سلول طبیعی HEK نیز دارای خاصیت سمی است و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند رشد سلول را حدود ۱۵ درصد کاهش دهد. نتایج ما بیانگر آن بود که این پروتئین دارای خاصیت سایتوتوکسیک بوده، بر روی سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی دارای سمیت بیشتری است.

در دهه‌ی اخیر، این پروتئین به عنوان یک پروتئین مهم در ژن درمانی در سلول‌های مختلفی معرفی شده است. Amado و Chen پیشنهاد نمودند که از پروتئین VSVG، به دلیل تروپیسم وسیع، می‌توان در یک پروسه‌ی سودوتایپینگ جهت ساخت ناقل‌های لنتی‌ویروس و رتروویروس کاذب استفاده کرد و تنها محدودیت آن، سمیت پروتئین است (۹).

در مطالعه‌ای دیگر، Qiao و همکاران نشان دادند که پروتئین VSVG یک پروتئین پوششی مناسب برای ساخت ناقل‌های ویروسی کاذب است و همچنین، به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی مؤثر است (۸). در پژوهش انجام شده توسط Miyanohara نیز پیشنهاد گردید که

استفاده‌ی بیش از حد مطلوب از پروتئین VSVG در ژن‌درمانی، برای سلول‌های گیرنده، توکسیک است (۷).

Coil و Miller با مطالعه‌ای بر روی پروتئین VSVG نشان دادند که تروپیسم وسیع پروتئین، به دلیل وجود یک لیپید غشایی (فسفاتیدیل سرین) در سطح سلول‌ها است که می‌تواند، به عنوان گیرنده عمل کند و ۱۹ آمینواسید از این پروتئین، به طور محکم به فسفاتیدیل سرین متصل می‌شود (۱۰).

در پژوهش دیگری توسط Sun و همکاران نیز نشان داده شد که اتصال پروتئین VSVG در حضور گروه‌های فسفولیپید اسیدی، مثل فسفاتیدیل سرین، افزایش می‌یابد (۱۱). این در حالی است که Dobrzynska و همکاران پیشنهاد نمودند که سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی، قادر به بیان مقادیر بیشتری از مولکول‌های آنیونیک، مثل فسفاتیدیل سرین(بیشتر از ۹ درصد از فسفولیپیدهای غشا)، هستند (۱۲).

نتایج این مطالعات بیانگر آن است که پروتئین VSVG تمایل بیشتری جهت اتصال به سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر نیز سمیت بیشتر پروتئین بر روی سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی، بیانگر آن است که احتمال دارد، به دلیل وجود گروه‌های فسفولیپیدی، نظیر فسفاتیدیل سرین، در سطح سلول‌های سرطانی که می‌تواند به عنوان گیرنده‌ی پروتئین عمل نماید، پروتئین تمایل بیشتری جهت اتصال به سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های طبیعی، نشان می‌دهد.

از آن جایی که این پروتئین فقط در غلظت‌های بالا برای سلول‌های طبیعی دارای خاصیت سمی است، به نظر می‌رسد که با مطالعات بیشتر بر روی این پروتئین بتوان از آن، به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی استفاده نمود. بررسی سایتوتوکسیسیتی اولین گام در بررسی آپوپتوز است. در این روش، میزان مرگ سلولی مورد ارزیابی قرار گرفته، نمی‌توان آپوپتوز را از نکروز متمایز نمود.

ارزیابی تغییرات مرفولوژیک نقش کلیدی در مطالعات مرگ سلولی دارد. در پژوهش حاضر، این تغییرات بعد از تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های CC50 از پروتئین VSVG مشاهده شد. بدین صورت که به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی با غلظت‌های CC50، درصدی از سلول‌ها از سطح فلاسک و سلول‌های مجاور جدا شد و چروکیدگی و تغییر شکل نیز در ظاهر سلول‌ها مشاهده گردید.

این نتایج نشان می‌دهد که احتمال دارد، پروتئین VSVG بتواند در القای آپوپتوزنقش داشته باشد؛ البته، نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری وجود دارد. از آن جایی که، داروهای شیمی‌درمانی در القای آپوپتوز نقش دارند، با انجام مطالعات بیشتر بر روی پروتئین VSVG و شناسایی دومین و پپتید مسؤول این خصوصیت توکسیک آپوپتوز، شاید بتوان از آن به عنوان عامل سایتوتوکسیک جهت درمان سلول‌های سرطانی استفاده نمود.

امروزه پپتیدهای ضدسرطانی به عنوان یک نسل جدید از داروهای ضدسرطان معرفی می‌شوند. پپتیدها بر خلاف داروهای ضدسرطانی، نیازی به ورود به داخل سلول ندارند و بر غشای سلول عمل می‌کنند؛ در حالی که، داروها بایستی وارد سلول شوند و در نتیجه، سلول‌ها با خارج کردن داروها

موجب افزایش مقاومت به دارو می‌شوند. همچنین، پپتیدها دارای فعالیت سایتوتوکسیک کم برای سلول‌های طبیعی پستانداران می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج بیانگر آن است که با انجام مطالعات بیشتر بر روی پروتئین VSVG و شناسایی پپتید مسؤول خاصیت توکسیک آن می‌توان، تغییراتی در جهت کاهش خاصیت سمی آن ایجاد نمود. همچنین، با انجام مطالعات بیشتر می‌توان این پروتئین را به عنوان یک پروتئین سایتوتوکسیک جهت کشتن سلول‌های سرطانی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسؤولان محترم دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران که در انجام این طرح ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Sanders DA. No false start for novel pseudotyped vectors. Curr Opin Biotechnol 2002; 13(5): 437-42.
2. Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von LD. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. J Virol 2002; 76(3): 1488-95.
3. Galipeau J, Li H, Paquin A, Sicilia F, Karpati G, Nalbantoglu J. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. Cancer Res 1999; 59(10): 2384-94.
4. Rose JK, Whitt MA. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Field's Virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1221–44.
5. Gaudin Y, Ruigrok RW, Knossow M, Flamand A. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. J Virol 1993; 67(3): 1365-72.
6. Yu H, Eton D, Wang Y, Kumar SR, Tang L, Terramani TT, et al. High efficiency in vitro gene transfer into vascular tissues using a pseudotyped retroviral vector without pseudotransduction. Gene Ther 1999; 6(11): 1876-83.
7. Miyanohara A. Preparation of vesicular stomatitis virus-G (VSV-G) conjugate and its use in gene transfer. Cold Spring Harb Protoc 2012; 2012(4): 453-6.
8. Qiao J, Moreno J, Forshaw M, Diaz RM, Vile RG. 741. VSV-G pseudotyped, MLV-based, semi-replication-competent retroviruses for cancer gene therapy. Mol Ther 2004; 9(S1): S282.
9. Amado RG, Chen IS. Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach? Science 1999; 285(5428): 674-6.
10. Coil DA, Miller AD. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. J Virol 2004; 78(20): 10920-6.
11. Sun X, Belouzard S, Whittaker GR. Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein. J Biol Chem 2008; 283(10): 6418-27.
12. Dobrzynska I, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. Mol Cell Biochem 2005; 276(1-2): 113-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 29.11.2014
Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015
Accepted: 24.02.2015

Producing Vesicular Stomatitis Virus G (VSVG) Protein and Assessment of its Cytotoxic Activity against Breast Cancer Cells

Fereshteh Ghandehari MSc[1], Mandana Behbahani PhD[2], Abbasali Pourazar PhD[3], Zahra Nourmohammadi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: The vesicular stomatitis virus G (VSVG) protein is a transmembran glycoprotein, which is involved in virus attachment to the specific receptor at the cell surface. This protein has been widely used to study therapeutic gene delivery. However, the major limitation of its usage in gene therapy is toxicity of protein for host cells in high concentrations.

Methods: The vesicular stomatitis virus G protein was produced via transfection of HEK-293T cells with using polyfection kit. The cytotoxic activity was examined against MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines and human embryonic kidney normal cell line (HEK293) using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and morphology changes assay.

Findings: The cytotoxic activity of vesicular stomatitis virus G protein against MCF-7 and MDA-MB-231 cells was significantly more than that of the normal cells ($P < 0.05$). In addition, cancer cells treated with vesicular stomatitis virus G protein showed morphology changes.

Conclusion: The results indicated that cytotoxic activity of vesicular stomatitis virus G protein against MCF-7 and MDA-MB-231 cells was more than that of the normal cells and it could be an appropriate candidate for in-vivo testing as cytotoxic agent.

Keywords: Vesicular stomatitis virus G protein, Cytotoxic, Transfection

Citation: Ghandehari F, Behbahani M, Pourazar A, Nourmohammadi Z. **Producing Vesicular Stomatitis Virus G (VSVG) Protein and Assessment of its Cytotoxic Activity against Breast Cancer Cells.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 221-30

1- PhD Student, Department of Biology, School of Sciences, Islamic Azad University, Tehran Sciences and Research Branch, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, School of New Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, Islamic Azad University, Tehran Sciences and Research Branch, Tehran, Iran
Corresponding Author: Fereshteh Ghandehari MSc, Email: ghandehari@iaufala.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۶

شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا

علی عینلو[۱]، دکتر پروین دهقان[۲]، دکتر مجتبی صلوتی[۳]، دکتر سینا میرزااحمدی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کاندیدا گلابراتا یکی از شایع‌ترین گونه‌های جنس کاندیدا است که به دلیل توانایی کسب مقاومت دارویی، شناسایی سریع آن جهت درمان عفونت‌ها ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های شناسایی متداول گونه‌های کاندیدا اغلب وقت‌گیر و پر دردسر هستند. امروزه، استفاده از نانوذرات، به دلیل خصوصیات منحصر به فردشان، گسترش زیادی یافته است. هدف از تحقیق حاضر، تشخیص سریع آزمایشگاهی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا بود.

روش‌ها: کاندیدا گلابراتا در محیط مایع Yeasts Extract Peptone Dextrose (YEPD) کشت داده شد و DNA آن استخراج گردید. سپس توالی ژن اختصاصی آن (CAGL0M05005g) از بانک اطلاعات ژنتیک کاندیدا به دست آمد. جهت انجام Polymerase chain reaction (PCR)، پرایمرها و پروب مربوط توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی گردید. محصول PCR و پروب تحت دناتوراسیون و دمای اتصال بهینه قرار گرفت. سپس نانوذرات طلا به آن افزوده شد و تغییر رنگ محلول به صورت چشمی و با استفاده از اسپکتروفتومتر Ultraviolet-visible (UV-vis) و Transmission electron microscopy (TEM) بررسی گردید. جهت بررسی حساسیت روش جدید، از محصول PCR با رقت‌های مختلف استفاده شد و نتایج با روش ژل الکتروفورز مقایسه گردید.

یافته‌ها: دماهای بهینه‌ی اتصال پرایمر به DNA الگو و هیبریداسیون پروب تعیین گردید. پس از افزودن نانوذرات طلا، رنگ محلول از قرمز به بنفش تغییر یافت و نتایج حاصل با استفاده از اسپکتروسکوپی و TEM تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که روش جدید یک روش سریع نسبت به روش‌های متداول و حساس نسبت به روش ژل الکتروفورز جهت شناسایی کاندیدا گلابراتا می‌باشد.

واژگان کلیدی: کاندیدا گلابراتا، نانوذرات طلا، رنگ سنجی

ارجاع: عینلو علی، دهقان پروین، صلوتی مجتبی، میرزااحمدی سینا. **شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۴۱-۲۳۱

مقدمه

در طی دهه‌های اخیر افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، کورتیکواستروئیدها، داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی، شیمی درمانی، رادیوتراپی، افزایش بیماری‌های نقص سیستم ایمنی، دیابت و ...، راه را برای گسترش طیف وسیعی از عفونت‌های

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
۴- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر پروین دهقان
Email: dehghan@med.mui.ac.ir

فرصت طلب مخاطی، جلدی، گوارشی، ریوی و سیستمیک قارچی هموار کرده است (۱). عفونت کاندیدایی، در صورت تهاجم شدید، حتی ممکن است به مرگ بیمار منتهی شود (۳-۲). هر چند کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی بسیاری از عفونت‌های کاندیدایی به شمار می‌رود. گزارش‌های اخیر از کشورهای مختلف، تغییر در الگوی اپیدمیولوژی این بیماری به سمت گونه‌های غیرآلبیکنس (Non-albicans) را نشان می‌دهد (۶-۴). طی دهه‌های اخیر، افزایش کاندیدمی ناشی از کاندیدا گلابراتا (C. glabrata)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (C. parapsilosis) و کاندیدا کروزه‌ای (C. krusei)، به خصوص در بیماران مبتلا به سرطان، افزایش نگران کننده‌ای داشته است (۷). در سال ۲۰۰۹، کاندیدا گلابراتا پس از کاندیدا آلبیکنس به عنوان دومین عامل کاندیدیازیس سطحی و مهاجم بزرگسالان در ایالات متحده گزارش شده است (۸). همچنین، کاندیدا گلابراتا به عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی اهمیت داشته و طبق تحقیق به عمل آمده توسط Fraser و همکاران، در بین گونه‌های کاندیدایی عامل ایجاد عفونت در بیماران مستعد، رتبه‌ی چهارم را به دست آورده است (۹). از ویژگی‌های آزمایشگاهی این قارچ، وجود بلاستوکونیدی‌های بیضی شکل و عدم توان تولید میسلیوم کاذب (Pseudohyphae)، لوله‌ی زایا (Germ tube) و کلامیدیوکونیدی (Clamydoconidia) است. همچنین، در محیط کشت CHROMagar، ایجاد کلنی‌های صورتی رنگ می‌نماید. به طور کلی، در مقایسه با کاندیدا آلبیکنس، در مورد سایر گونه‌های کاندیدا مطالعات اندکی صورت گرفته است. لذا، شناسایی این ارگانیسم و تلاش در جهت پیش‌گیری از عفونت و نیز درمان صحیح و به موقع بیماری ضروری به نظر می‌رسد (۱۰).

روش‌های مختلفی برای شناسایی گونه‌های کاندیدا وجود دارد. روش‌های متداول و قدیمی بیشتر مبتنی بر خصوصیات مورفولوژی از قبیل ویژگی‌های کلنی بر روی محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar، ایجاد لوله‌ی زایا و کلامیدوکونیدی و نیز خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی، نظیر الگوهای جذب و تخمیر قندها، می‌باشد (۱۳-۱۱). برای انجام این روش‌ها جهت شناسایی ایزوله‌ها، چندین روز زمان لازم است. در سالیان اخیر روش‌های شناسایی ژنوتیپی، به خصوص استفاده از تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) گسترش قابل توجهی یافته و توانایی شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تر را نسبت به روش‌های قدیمی فراهم کرده است (۱۴). تجزیه و تحلیل نتایج PCR با استفاده از الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز یا اکریل‌آمید صورت می‌گیرد که علاوه بر نیاز به تجهیزات و مواد مربوط، به نسبت زمان‌بر است. مدل‌های پیشرفته‌ای از PCR، مانند Real-time PCR، با استفاده از فن‌آوری انتقال انرژی فلورسانس تشدید یافته، باعث تسریع در روند تشخیص مولکولی شده است؛ با این وجود، برای انجام Real-time PCR، نیاز به فراهم نمودن پروب های اختصاصی است که موجب پرهزینه شدن روش می‌گردد (۱۵).

روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا (GNPs یا Gold nanoparticles)، یک روش جدید به نسبت سریع و حساس می‌باشد که تشخیص DNA تکثیر شده (در صورت وجود) با استفاده از پروب تک

رشته‌ای و نانوذرات طلا با ایجاد تغییر رنگ مخلوط واکنش صورت می‌گیرد.

نانوذرات (Nanoparticles) دارای خصوصیات بی‌نظیری از قبیل اندازه‌ی بسیار کوچک، نسبت سطح بزرگ به حجم و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاصی می‌باشند که مواد در مقیاس بزرگ‌تر فاقد این ویژگی‌ها هستند. در واقع، اندازه‌ی ذره به حدی می‌رسد که بر اثرات کوانتومی غلبه کرده، علاوه بر تأثیر بر ویژگی‌های ذره، بر روی واکنش آن با سایر ذرات نیز تأثیر گذار است (۱۸-۱۶). فلز طلا نیز هنگامی که به ابعاد نانو در می‌آید، خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی از خود نشان می‌دهد و تغییرات محسوسی در رنگ آن بسته به سایز ذرات دیده می‌شود (۲۰-۱۹). اصول روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا، بر این اساس است که اگر DNA مورد نظر تکثیر یافته باشد، پروب مربوط با محصول PCR مکمل شده، نانوذرات طلا به صورت آزاد و رها در محلول باقی مانده، اضافه نمودن محلول نمک موجب تجمع نانوذرات طلا و تغییر رنگ می‌شود (۲۱). در صورت عدم حضور محصول PCR اختصاصی پروب‌ها در محلول به صورت آزاد و رها باقی مانده، با جذب نانوذرات طلا مانع از تجمع آن‌ها شده، هیچ گونه تغییر رنگی رخ نمی‌دهد. هدف از تحقیق حاضر، راه‌اندازی یک روش جدید مبتنی بر نانوتکنولوژی جهت شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا است.

روش‌ها

آنزیم تک پلیمراز، دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات، PCR بافر، DNA سایز مارکر، کلرید منیزیم، اتیدیوم بروماید، بافر TBE (Tris/Borate/ Ethylenediaminetetraacetic acid) از شرکت سیناکلون و نانوذرات طلا از شرکت US NANO خریداری گردید. سفارش ساخت پرایمرها و پروب طراحی شده به شرکت ژن فن‌آوران ایران داده شد. همچنین، سویه‌ی استاندارد کاندیدا گلابراتا (PTCC5297) از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه گردید.

کشت میکروارگانیسم: ابتدا مخمر مذکور در محیط کشت قارچی Sabouraud dextrose agar کشت داده شد. پس از ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های به دست آمده از لحاظ ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. جهت حصول اطمینان از ویژگی‌های مورفولوژی بر روی محیط CHROMagar کاندیدا، Corn Meal Agar توئین ۸۰ و نیز سرم به منظور بررسی رنگ کلنی، ایجاد میسلیوم کاذب و لوله زایا کشت داده شد.

استخراج DNA: تولید انبوه میکروارگانیسم با تلقیح آن در محیط کشت مایع Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) به مدت ۳۰-۲۴ ساعت در انکوباتور Shakerدار با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه انجام و DNA مخمر به صورت دستی و با استفاده از روش اعمال حرارت و برودت استخراج شد (۲۲). جهت اطمینان از نتیجه‌ی استخراج DNA، محصول به دست آمده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز و بررسی گردید.

طراحی پرایمر و پروب: توالی ژن اختصاصی کاندیدا گلابراتا (CAGL0M05005g) از بانک اطلاعات ژنتیک کاندیدا (candidagenome.org) به دست آمد و جهت انجام PCR، پرایمرهای پیش‌ران (Forward primer) و برگشتی (Reverse primer) برای تکثیر اختصاصی توالی ژن فوق توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی و توالی آن به صورت زیر به دست آمد:

Forward primer:
5′ GAGTGGTATGACGAGCAATGGT3′
Reverse primer:
5′TTGTATTGAAGATTCCCTCCCATATATC3′

پروب الیگونوکلئوتیدی مکمل محصول PCR در موقعیت داخلی نیز توسط نرم‌افزار Oligo 5 طراحی و توالی مذکور به صورت زیر به دست آمد:

Probe: 5′TACGGCTGGCGATTG3′

اختصاصی بودن توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای شناسایی ژن اختصاصی کاندیدا گلابراتا در سایت National Center of Biotechnology (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Blast بررسی و تأیید شد.

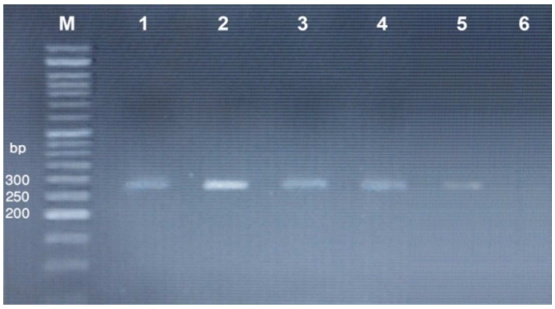
PCR: برای انجام PCR، از مواد زیر با غلظت‌های ذکر شده برای هر واکنش ۳۰ میکرولیتری استفاده شد: PCR Buffer (۱X)، MgCl2 (۱/۵ mM)، dNTP (۰/۱ mM)، پرایمر پیش‌ران و برگشتی هر کدام ۲۰ Pmol، DNA template (۱۰ ng) و آنزیم Taq DNA polymerase (۱ U). جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمر برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (Eppendorf Gradient Mastercycler) و با اعمال شیب دمایی استفاده گردید. پس از اتمام PCR، جهت اطمینان از انجام تکثیر مطلوب محصولات به دست آمده با دماهای مختلف در ژل آگارز ۲ درصد با روش الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و واضح‌ترین باند الکتروفورزی که نشان‌گر بهترین دمای اتصال برای انجام PCR ژن (CAGL0M05005g) بود، تعیین گردید.

رنگ‌سنجی: بهینه سازی دمای هیبریداسیون پروب به محصول PCR نیز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیان و با اعمال شیب دمایی انجام گردید. برای این کار، ابتدا ۴ میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری انتخاب و داخل هر کدام، مقدار ۵ میکرولیتر بافر فسفات ریخته شد. سپس، مقدار ۲۰۰ نانوگرم محصول PCR و ۱۰۰ نانوگرم پروب الیگونوکلئوتیدی به مخلوط اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا دو رشته‌ی DNA از هم جدا شوند؛ سپس، به مدت ۱۰ دقیقه جهت اتصال پروب به محصول PCR تحت گرادیان دمایی قرار گرفت. پس از خارج نمودن از دستگاه ترموسایکلر، به هر کدام مقدار ۷۰ میکرولیتر نانوذرات طلای کروی با سایز ۱۵ نانومتر که به وسیله‌ی آب دیونیزه رقیق شده بود، اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس، به تدریج محلول کلرید سدیم ۰/۵ مولار اضافه شد و نحوه‌ی تغییر رنگ مخلوط واکنش به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت و دمای بهینه‌ی هیبریداسیون پروب به محصول PCR، از روی بیشترین و واضح‌ترین تغییر رنگ تعیین شد. برای اطمینان از صحت عملکرد این روش، از کنترل منفی نیز استفاده گردید. جهت این کار، در ۴ لوله‌ی مربوط، به عنوان کنترل منفی، از آب دیونیزه به جای محصول PCR اختصاصی استفاده شد و آزمون رنگ‌سنجی بر روی آن‌ها نیز صورت گرفت و تغییر

رنگ نمونه‌ها بررسی شد. جهت تأیید نتایج میزان جذب نوری، واکنش‌های مثبت و منفی با استفاده از اسپکتروسکوپی جذب Ultraviolet–visible (UV-vis) بررسی شد. همچنین، برای مانیتورینگ تجمع نانوذرات طلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmition Electron Microscope یا TEM) مدل Philips EM 208، نمونه‌های واکنش مثبت (حاوی محصول PCR اختصاصی کاندیدا گلابراتا) و نمونه‌های کنترل منفی (حاوی آب دیونیزه) مورد عکس‌برداری قرار گرفت. برای سنجش حساسیت روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا نسبت به روش ژل الکتروفورز، از محصولات PCR رقیق شده با نسبت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰ و ۱:۲۰ استفاده شد و با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ‌سنجی، نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

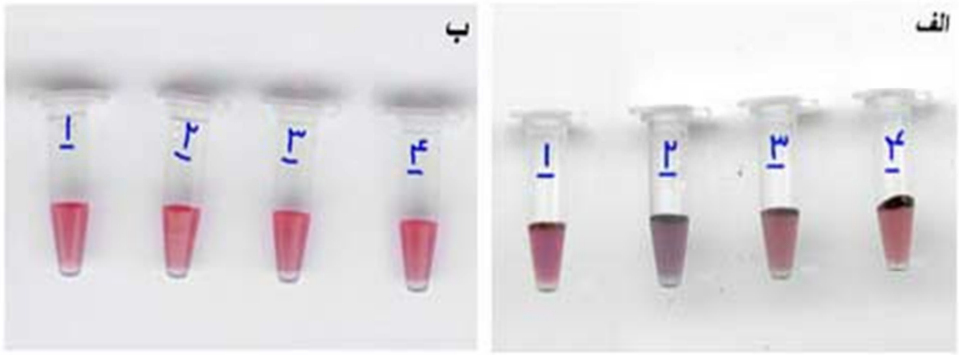
در بررسی نتایج کشت سویه‌ی استاندارد کاندیدا گلابراتا بر روی محیط Corn Meal Agar حاوی توئین ۸۰، تنها بلاستوکونیدی‌های بیضی شکل ریز و بدون سودوهایف و کلامیدیوکونیدی مشاهده شد. همچنین در محیط سرم، جرم تیوب مشاهده نشد و در محیط کشت CHROMagar، کلنی‌های صورتی رنگ مشاهده گردید که نتایج تأییدی بر ویژگی‌های کاندیدا گلابراتا بود (۲۳). پس از انجام PCR ژن اختصاصی کاندیدا گلابراتا (CAGL0M05005g) در دماهای مختلف، محصولات به دست آمده بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید و با استفاده از دستگاه Transiluminator (UV TEC, UK) تحت تابش اشعه‌ی ماورای بنفش، باند مربوط مشاهده شد (شکل ۱). واضح‌ترین باند الکتروفورزی که نشان‌گر بهترین دمای اتصال برای انجام PCR ژن مذکور بود، در دمای ۵۱/۳ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید و با استفاده از سیستم Gel documentation عکس‌برداری شد (باند شماره‌ی ۲).



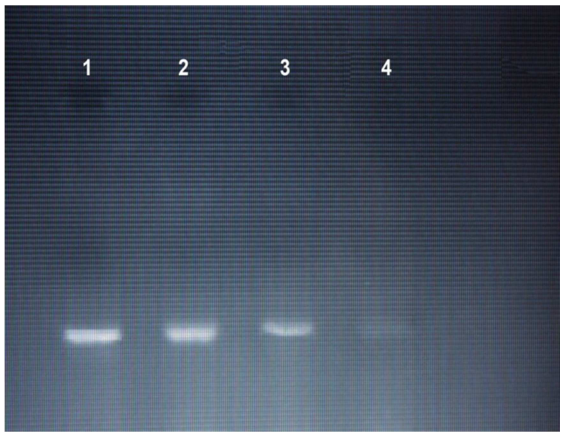
شکل ۱. باند محصولات Polymerase chain reaction ژن (CAGL0M05005g) بر روی ژل آگارز
M: سایز مارکر شرکت سیناژن 50bp DNA Ladder
۶-۱ به ترتیب دماهای اتصال ۵۰/۳، ۵۱/۳، ۵۲/۲، ۵۳/۳، ۵۴/۴ و ۵۵/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

با انجام آزمون رنگ‌سنجی در لوله‌هایی که دارای محصول PCR اختصاصی بودند، تغییر رنگ قرمز به بنفش مشاهده شد ولی در لوله‌های کنترل منفی، که فاقد محصول PCR اختصاصی بودند، هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد. در لوله‌های واکنش مثبت نیز بیش‌ترین تغییر رنگ مربوط به بهینه‌ی دمای اتصال پروب به محصول PCR بود که ۴۷/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید (شکل ۲).

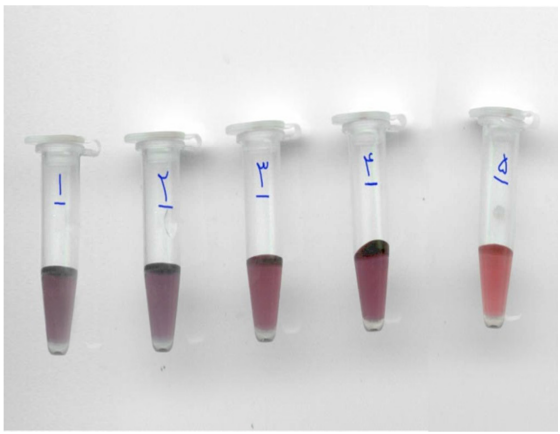
در بررسی حساسیت آزمون رنگ‌سنجی نسبت به ژل الکتروفورز، پس از الکتروفورز محصولات PCR رقیق شده بر روی ژل آگارز، در ردیف مربوط به رقت‌های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۱۰ باند مربوط مشاهده شد؛ در حالی که با رقت ۱:۲۰، باند واضحی روی ژل آگارز مشاهده نگردید (شکل ۳).



شکل ۲. عکس لوله‌های آزمون رنگ سنجی؛ الف: لوله‌های واکنش مثبت، ب: لوله‌های کنترل منفی ردیف‌های ۴-۱ به ترتیب مربوط به دماهای اتصال ۴۶/۸، ۴۷/۹، ۴۸/۹ و ۴۹/۴ درجه‌ی سانتی‌گراد



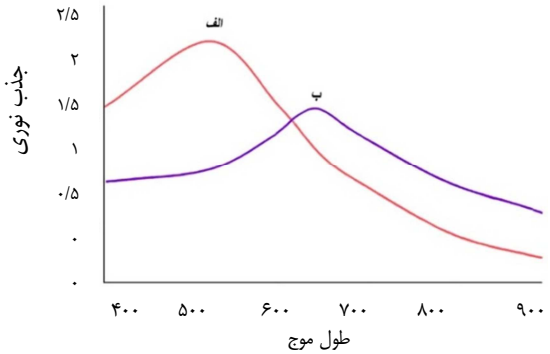
شکل ۳. باند محصولات Polymerase chain reaction ژن (CAGL0M05005g) رقیق شده بر روی ژل آگارز ردیف‌های ۴-۱ به ترتیب رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰ و ۱:۲۰



شکل ۴. عکس لوله‌های روش رنگ سنجی لوله‌های ۴-۱ به ترتیب مربوط به رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰، ۱:۲۰ محصول Polymerase chain reaction و لوله‌ی شماره‌ی ۵: کنترل منفی

از همان رقت‌ها برای انجام عمل رنگ‌سنجی نیز استفاده شد و تغییر رنگ صورتی به بنفش در تمامی رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۱۰ و ۱:۲۰ قابل مشاهده بود (شکل ۴).

با انجام اسپکتروسکوپی نمونه‌های مورد آزمایش، واکنش‌های مثبت (نمونه‌هایی که تغییر رنگ صورتی به بنفش داشتند) بیشترین جذب نوری را در طول موج ۶۵۰ نانومتر نشان دادند؛ در حالی که، برای واکنش‌های کنترل منفی، بیشترین جذب نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر به دست آمد (شکل ۵).



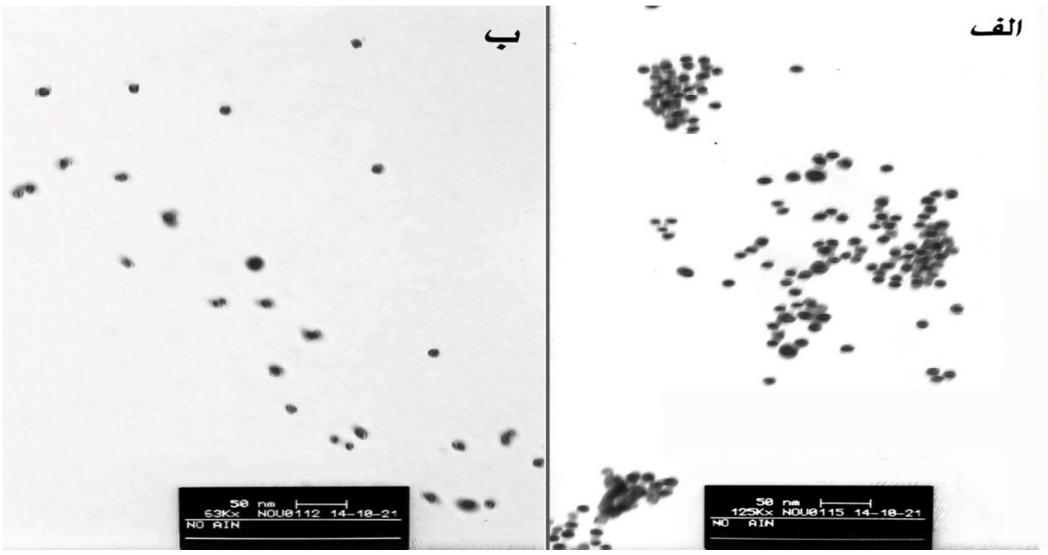
شکل ۵. نمودار الف: λMax واکنش کنترل منفی (عدم حضور محصول تکثیر یافته)
نمودار ب: λMax واکنش مثبت (حضور محصول تکثیر یافته)

با استفاده از عکس‌برداری توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری، تجمع نانوذرات طلا در نمونه‌های واکنش مثبت، آن‌هایی که تغییر رنگ صورتی به بنفش داشتند، و عدم تجمع نانوذرات طلا در نمونه‌های کنترل منفی (عدم تغییر رنگ) مشخص گردید (شکل ۶).

بحث

شناسایی گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش‌های تشخیص آزمایشگاهی متداول، همانند به کارگیری محیط‌های کشت معمولی مانند Sabouraud dextrose agar و عصاره‌ی مالت آگار امکان‌پذیر نمی‌باشد. ایراد به کار گیری محیط کشت افتراقی کروموژنیک CHROMagar کاندیدا، محدودیت در شناسایی گونه‌ها است؛ ضمن این که، به زمان بیشتری برای دست‌یابی به جواب نیازمند است. آزمون‌های بیوشیمیایی، وقت‌گیر و یا در بعضی موارد پرهزینه هستند. آزمایش‌های سرولوژی، حساسیت یا جنبه‌ی اختصاصی محدودی دارند. آنتی‌بادی سرمی و ایمنی با واسطه‌ی سلولی نیز در اکثر افراد قابل مشاهده هستند که ناشی از تماس دائمی با مخمر کاندیدا می‌باشند. سنجش آنتی‌بادی در افراد با ایمنی سرکوب شده نیز به علت عدم توانایی پاسخ به عفونت، دشوار است.

آزمون بررسی تولید لوله‌ی زایا یکی از ابتدایی‌ترین روش‌های تشخیص کاندیدا آلبیکنس از گونه‌های غیرآلبیکنس است که البته با پیدایش گونه‌های جدید دارای خصوصیت تولید لوله‌ی زایا، برای شناسایی دقیق گونه، انجام آزمایشات تکمیلی ضروری است. استفاده از محیط کشت Corn Meal Agar، جهت بررسی توانایی تولید بلاستوکونیدی، کلامیدوکونیدی و میسلیوم کاذب علاوه بر وقت گیر بودن، به طور کامل اختصاصی نبوده، شناسایی دقیق گونه‌ها مستلزم انجام آزمایشات دیگری است؛ چرا که، برخی از روش‌های تشخیصی متداول با پیدایش گونه‌های جدید در حقیقت اختصاصیت خود را از دست داده است.



شکل ۶. عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری؛ الف) مربوط به نمونه‌ی واکنش مثبت که تجمع نانوذرات طلا مشاهده می‌شود. ب) مربوط به نمونه‌ی واکنش منفی که نانوذرات طلا به‌صورت منفرد و پخش هستند.

به طور کلی، انجام تمامی روش‌های مذکور جهت شناسایی ایزوله‌ها، چندین روز زمان لازم داشته، به نفع بیمار و آزمایشگاه نمی‌باشد. استفاده از کیت‌های تجارتی API، سیستم خودکار Vitek و Sequencing نیز جهت شناسایی گونه‌ها، به دلیل هزینه‌ی زیاد غیر قابل کاربرد روزمره در آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی است (۲۴).

شناسایی گونه‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR، بر اساس خصوصیات ژنوتیپی استوار می‌باشد که در سالیان اخیر گسترش قابل توجهی یافته و شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تر را نسبت به روش‌های قدیمی فراهم کرده است (۱۵-۱۴). اما، تجزیه و تحلیل نتایج PCR، با استفاده از الکتروفورز محصول به دست آمده بر روی ژل صورت می‌گیرد که نیاز به تجهیزات و مواد مربوط دارد.

روش‌های تشخیصی رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات، به دلیل سادگی و چند منظوره بودن، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در سال‌های اخیر، شناسایی و تشخیص پاتوژن‌های مواد غذایی با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا گسترش یافته است (۲۵). Gill و همکاران توانستند 16S rRNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را به روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا شناسایی کنند (۲۶). در مطالعه‌ی Shankaracharya و همکاران در هند نیز با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا، در مدت زمان کوتاهی با حساسیت بالا، گونه‌های سالمونلا تشخیص داده شد (۲۱). تا زمان انجام این پژوهش، هیچ گونه تحقیقی در رابطه با تشخیص اختصاصی گونه‌های قارچی با استفاده از نانوذرات طلا به روش رنگ‌سنجی صورت نگرفته بود.

در تحقیق حاضر، از تکنیک PCR استفاده شد و با انجام آزمون رنگ‌سنجی، در واقع مرحله‌ی الکتروفورز محصول به دست آمده بر روی ژل حذف گردید؛ که علاوه بر سرعت عمل، نیاز به تجهیزات مربوط از قبیل تانک الکتروفورز، Power supply، Transilluminator، ژل Documentation و مواد مورد نیاز همچون آگارز یا اکریل‌آمید، اتیدیوم بروماید یا نیترات نقره، DNA size marker و... نیز مرتفع شد.

همچنین، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حساسیت روش رنگ‌سنجی بالا بوده، در زمان کوتاهی امکان تشخیص را بدون استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص و تنها به صورت چشمی و با استفاده از تغییر رنگ فراهم می‌سازد (۲۷). در صورت کم بودن مقدار محصول PCR با استفاده از الکتروفورز، احتمال مشاهده‌ی یک باند واضح کاهش می‌یابد؛ در صورتی که با همان مقدار می‌توان با استفاده از روش رنگ‌سنجی، نتیجه‌ی قابل قبولی گرفت.

یکی از محدودیت‌های مهم استفاده از نمونه‌های بالینی مستقیم در تشخیص‌های آزمایشگاهی، تعداد میکروارگانیسم کم در نمونه‌ی ارسالی به آزمایشگاه است که در نتیجه، ماده‌ی ژنتیکی در دسترس نیز کم می‌باشد. جهت رفع این اشکال، ابتدا میکروارگانیسم را کشت می‌دهند و سپس، اقدام به شناسایی می‌نمایند که انجام کشت، یک مرحله‌ی زمان‌بر است. امید است در این موارد، بدون انجام کشت بتوان با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا نتایج قابل قبولی گرفت.

به طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه با

روش‌های متداول آزمایشگاهی، با استفاده از روش رنگ‌سنجی بر پایه‌ی نانوذرات طلا، شناسایی اختصاصی کاندیدا گلابراتا در مدت زمان کمتر صورت می‌گیرد و نسبت به ژل الکتروفورز، با حساسیت بالا قابل انجام است.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد علی عینلو به شماره‌ی پایان‌نامه‌ی ۳۹۲۶۰۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد که در گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام و هزینه‌های آن توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردید. بدین وسیله، از همکاری و مساعدت مسؤولین مربوط، تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Burket LW, Greenberg M, Glick M. Burket's oral medicine: diagnosis and treatment. Hamilton, Ont: BC Decker; 2003.
2. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. Med Mycol 2007; 45(4): 321-46.
3. Koc M, Aktas E. Prophylactic treatment of mycotic mucositis in radiotherapy of patients with head and neck cancers. Jpn J Clin Oncol 2003; 33(2): 57-60.
4. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. New York, NY: Elsevier; 2011.
5. Mullen CA, Abd El-Baki H, Samir H, Tarrand JJ, Rolston KV. Non-albicans Candida is the most common cause of candidemia in pediatric cancer patients. Support Care Cancer 2003; 11(5): 321-5.
6. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002; 50(4): 243-60.
7. Safdar A, Perlin DS, Armstrong D. Hematogenous infections due to Candida parapsilosis: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44(1): 11-6.
8. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D, Burleson J. Oral Candida infection and colonization in solid organ transplant recipients. Oral Microbiol Immunol 2009; 24(3): 249-54.
9. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. Clin Infect Dis 1992; 15(3): 414-21.
10. Wingard JR, Leather H. A new era of antifungal therapy. Biol Blood Marrow Transplant 2004; 10(2): 73-90.
11. Dalle F, Franco N, Lopez J, Vagner O, Caillot D, Chavanet P, et al. Comparative genotyping of Candida albicans bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J Clin Microbiol 2000; 38(12): 4554-9.
12. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol 1994; 32(8): 1923-9.
13. Tan GL, Peterson EM. CHROMagar Candida medium for direct susceptibility testing of yeast from blood cultures. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1727-31.
14. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 693-9.
15. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. J Immunol Methods 2003; 278(1-2): 261-9.
16. Hu M, Chen J, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li X, et al. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. Chem Soc Rev 2006; 35(11): 1084-94.
17. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Pharmacol Rev 2001; 53(2): 283-318.
18. West JL, Halas NJ. Applications of nanotechnology to biotechnology commentary.

Curr Opin Biotechnol 2000; 11(2): 215-7.
19. Jiao PF, Zhou HY, Chen LX, Yan B. Cancer-targeting multifunctionalized gold nanoparticles in imaging and therapy. Curr Med Chem 2011; 18(14): 2086-102.
20. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. Nanomedicine (Lond) 2007; 2(5): 681-93.
21. Shankaracharya PD, Vidyarthi AS. Gold nanoparticles-based colorimetric assay for rapid detection of Salmonella species in food samples. World J Microbiol Biotechnol 2011; 27(9): 2227-30.
22. Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. BMC Biotechnol 2004; 4: 8.
23. Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD, Crane LR. Fungemia caused by Candida species and Torulopsis glabrata in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. Rev Infect Dis 1989; 11(3): 379-90.
24. Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel A, Chandy R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of Candida albicans and Candida dubliniensis. BMC Infect Dis 2012; 12: 230.
25. Bai S, Zhao J, Zhang Y, Huang W, Xu S, Chen H, et al. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 86(3): 983-90.
26. Gill P, Ghalami M, Ghaemi A, Mosavari N, Abdul-Tehrani H, Sadeghizadeh M. Nanodiagnostic Method for Colorimetric Detection of Mycobacterium tuberculosis 16S rRNA. Nanobiotechnol 2008; 4(1-4): 28-35.
27. Lee H, Kang T, Yoon KA, Lee SY, Joo SW, Lee K. Colorimetric detection of mutations in epidermal growth factor receptor using gold nanoparticle aggregation. Biosens Bioelectron 2010; 25(7): 1669-74.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 18.12.2014
Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015
Accepted: 25.02.2015

Specific Identification of Candida Glabrata via Colorimetric Assay Based on Gold Nanoparticles

Ali Einloo[1], Parvin Dehghan PhD[2], Mojtaba Saluti PhD[3], Sina Mirzaahmadi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Candida glabrata is one of the most common Candida species which is able to get resistant to antifungals. So, the rapid identification of it, seems to be necessary for early treatment of infections. The conventional methods for detection of Candida species are time-consuming and difficult. Today, using of nanoparticles with unique properties has been expanded. The purpose of this study was rapid identification of Candida glabrata using colorimetric assay based on gold nanoparticles.

Methods: Candida glabrata was cultured in yeast extract peptone dextrose broth medium and DNA was extracted. The gene specific sequence (CAGL0M05005g) was determined from the Candida genetic information bank. For polymerase chain reaction (PCR), the primers and probe were designed via Oligo 7 software. The PCR product and probe was affected by denaturation and optimized binding temperatures. The gold nanoparticles were added and changed the color to be visual; by using ultraviolet-visible (UV-vis) spectrophotometer and transmission electron microscopy (TEM), they were confirmed. To evaluate the sensitivity of new method, different concentrations of PCR product were used and the results were analyzed using gel electrophoresis.

Findings: The optimum temperatures of the primer binding to the DNA template and hybridization the probe was determined. After adding gold nanoparticles, the mixture solution color was changed from red to purple. The results were confirmed via spectroscopy and electron microscopy.

Conclusion: The results indicated that in detection of Candida glabrata, the new method is faster than conventional methods and more sensitive than gel electrophoresis.

Keywords: Candida glabrata, Colorimetric assay, Gold nanoparticles

Citation: Einloo A, Dehghan P, Saluti M, Mirzaahmadi S. **Specific Identification of Candida Glabrata via Colorimetric Assay Based on Gold Nanoparticles.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 231-41

1- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Biology Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
Corresponding Author: Parvin Dehghan PhD, Email: dehghan@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰

بررسی نگرش پزشکان جامعه درباره‌ی اخلاق پزشکی

دکتر قدرت اله مومنی[۱]، دکتر ندا یاوری[۲]، مریم قاسمی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اخلاق پزشکی از موضوعات مهم در حیطه‌ی پزشکی است. این مطالعه انجام گرفت تا گامی در جهت ارزیابی نگرش جامعه‌ی پزشکی اصفهان به مباحث اخلاق پزشکی برداشته شود؛ در مراحل بعدی، با توجه به ارزیابی‌های صورت گرفته، می‌توان نقاط ضعف و قوت را شناسایی کرد و گام‌های مؤثرتری در جهت تحقق اصول اخلاقی در جامعه پزشکی برداشت.

روش‌ها: طی یک مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی در سال ۱۳۹۲، ۱۰۳ نفر از پزشکان شاغل در شهر اصفهان مورد مطالعه قرار گرفتند و سطح نگرش آنان راجع به اخلاق پزشکی، با استفاده از پرسشنامه مورد سنجش قرار گرفت. داده‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین نمره‌ی نگرش این افراد در زمینه‌ی اخلاق پزشکی ۸/۹ ± ۴۸/۸ با دامنه‌ی ۹۶-۲۸ (از حداکثر نمره‌ی قابل اکتساب ۱۰۰) بود. بر این اساس، ۱ نفر (۱/۰ درصد) دارای سطح نگرش ضعیف، ۶۲ نفر (۶۰/۲) دارای سطح نگرش متوسط و ۴۰ نفر (۳۸/۸ درصد) دارای سطح نگرش مطلوب بودند.

نتیجه‌گیری: پزشکان شاغل به چگونگی و محتوای اصول اخلاق پزشکی، نگرش قابل قبولی داشتند؛ ولی سطح نگرش آنان در مقایسه با مطالعه‌های دیگر در حد مطلوب نیست. یکی از مهم‌ترین راهکارهای ارتقای نگرش پزشکان، اهمیت دادن به درس اخلاق پزشکی در زمان دانشجویی است.

واژگان کلیدی: اخلاق پزشکی، نگرش، پزشک

ارجاع: مومنی قدرت اله، یاوری ندا، قاسمی مریم. **بررسی نگرش پزشکان جامعه درباره‌ی اخلاق پزشکی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۵۱-۲۴۲

مقدمه

در دهه‌های اخیر، به علت گسترده شدن تحقیقات و پژوهش‌های پزشکی، ارتقای سطح آگاهی جوامع در زمینه‌های پزشکی، فرهنگی و اجتماعی و قانونمند شدن تحقیقات بر روی انسان و سایر موجودات، اهمیت اخلاق پزشکی دو چندان شده است؛ به طوری که در اعصار قبل، بسیاری از داروها، روش‌های درمانی و واکسن‌های کشف شده، حتی بدون اطلاع انسان‌ها، به گروه وسیعی از مردم تزریق می‌گردید تا نتایج حاصل مورد بررسی قرار گیرد؛ از نمونه‌های آن، می‌توان به آزمایشات دارویی و واکسن‌ها در جمعیت‌های آفریقایی توسط کشورهای پیشرفته و استعمارگر در طی قرون ۱۹ و ۲۰ اشاره نمود (۱).

در عصر حاضر، بسیاری از تحقیقات پزشکی که بر روی انسان، حیوان و حتی گیاهان انجام می‌گیرد،

۱- استادیار، گروه معارف اسلامی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان ایران
۲- پزشک عمومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر قدرت اله مومنی
Email: gh_momeni@mail.mui.ac.ir

جنبه قانونی پیدا کرده است و محققین هر رشته، ملزم به رعایت پروتکلی جهت به حداقل رساندن آسیب و تهاجم به آزمودنی‌ها هستند. از این رو، افرادی که در معرض آزمون قرار می‌گیرند، به صورت آگاهانه و با امضای فرم‌های رضایت‌نامه و برائت‌نامه، در تحقیقات شرکت نموده، هر موقع که احساس کنند امکان ادامه شرکت در تحقیق برای آن‌ها میسر نیست و یا با خطرات و عوارض احتمالی مواجه هستند، می‌توانند از مطالعه خارج شوند (۲).

چنین پروتکلی در مورد حیوانات نیز وجود دارد و مطابق آن، محققین وظیفه دارند در آزمایشاتی که بر روی حیوانات انجام می‌دهند، ضوابط قانونی مربوط به کاهش عوارض درمان را رعایت کنند. دامنه‌ی فعالیت انجمن‌های رعایت اخلاق پزشکی در ابتدا به رعایت جنبه‌های اخلاقی در مداخلات بر روی انسان و حیوان محدود می‌گردید ولی به مرور زمان، گستره‌ی وسیع‌تری پیدا کرده است؛ به طوری که امروزه اکثریت قریب به اتفاق مداخلات پزشکی اعم از پژوهش‌های بالینی و کارآزمایی‌ها، درمان با روش‌های جدید، محروم کردن از روش درمان به منظور بررسی نتایج، آگاهی از بیماری، آگاهی از عوارض درمان، استفاده از پرونده‌ی بیماران و ... در فهرست موضوعات اخلاق پزشکی قرار دارد (۳).

بعد دیگری که در زمینه‌ی اخلاق پزشکی بسیار مورد توجه قرار دارد، به روابط بین پزشک و بیمار مربوط می‌گردد. در سال‌های اخیر، با افزایش موارد مشکل اخلاقی، ترویج اخلاق حرفه‌ای در میان دانشجویان پزشکی اهمیت خاصی یافته است (۱). افزایش موارد مشکل اخلاقی ناشی از دلایل متعددی می‌باشد که یکی از این دلایل، مواجهه‌ی پزشکان با وسایل و ابزارهای جدید پزشکی، نظیر روش‌های جدید کمک باروری، بدون وجود راهنمایی‌های اجتماعی مناسب جهت استفاده از آن‌ها است (۲). به علاوه، دانشجویان پس از گذراندن دوره‌ی تحصیل، دارای باورها و رفتارهای خاص حرفه‌ای می‌شوند که متأسفانه تا حدی حساسیت‌های اخلاقی آن‌ها را کاهش می‌دهد و تصمیم‌گیری اخلاقی را برای آن‌ها دشوار می‌سازد (۳). هر چند، تعداد پزشکانی که رفتارهای غیر اخلاقی دارند، نسبت به کل پزشکان بسیار کم است، ولی یک عملکرد نادرست می‌تواند موجب از دست رفتن اعتماد و باور مردمی به کل پزشکان در سطح جامعه گردد (۴). از این رو، نیاز به داشتن پزشکان متعهد و آگاه به چگونگی برخورد با موارد دشوار اخلاقی، از محرک‌های اساسی تحول در امر آموزش اخلاق پزشکی است.

Huijer و همکاران، در بررسی ۵۰۰ مورد مشکل اخلاقی که کارورزان با آن‌ها مواجه شده بودند، نتیجه‌گیری کردند که استادان می‌بایستی نحوه‌ی برخورد با انواع موارد مشکل اخلاقی را در برنامه‌ی درسی خود به دانشجویان آموزش دهند (۵). از سوی دیگر، Koh نیز نشان داد که پیشرفت‌های پزشکی موجب تضعیف رابطه‌ی پزشک و بیمار شده است. همچنین، مواجهه‌ی هر چه بیشتر با مسایل اخلاقی، موجب تمایل بیشتر دانشجویان به فراگیری رویکردهای اخلاقی مربوط به ارتباط با بیمار می‌شود (۶).

استادان و برنامه‌ریزان آموزش اخلاق پزشکی در ژاپن تأکید می‌کنند که آموزش می‌بایستی به صورت بین گروهی و با همکاری متخصصان اخلاق پزشکی و استادان فلسفه‌ی اخلاق صورت گیرد (۷).

Holm و همکاران نیز نشان دادند که دانشجویان

پس از گذراندن دوره‌ی اخلاق پزشکی، نسبت به موارد مشکل اخلاقی درک بهتری پیدا می‌کنند (۸).

همزمان با پیشرفت و توسعه‌ی موازین مربوط به اخلاق پزشکی، در بعد آموزشی نیز شاهد گسترش آن در سطح دانشگاه‌ها و مراکز آموزش عالی می‌باشیم؛ به طوری که اخلاق پزشکی، که در ابتدا هیچ جایگاهی در متون آموزش پزشکی نداشت، با اجرای برنامه‌های انقلاب فرهنگی در کشور، به صورت یک واحد درسی مستقل در سطح بسیاری از دانشگاه‌ها ارایه گردید و بدین طریق، با ارتقای سطح آگاهی دانشجویان، زمینه‌ی تدوین و اجرای برنامه‌های مربوط به حیطه‌ی اخلاق پزشکی در سطح دانشگاه‌ها فراهم شد (۹). به یمن این فعالیت‌های گسترده، امروزه شاهد فعال‌سازی واحدها و کمیته‌های اخلاق پزشکی در سطح کلیه‌ی دانشگاه‌های علوم پزشکی در سراسر کشور می‌باشیم؛ ولی در عین حال، توسعه‌ی آموزش اخلاقی خود با چالش‌های متعددی روبه‌رو بوده است.

دشواری در رعایت منشور اخلاق پزشکی، اغلب ناشی از تنوع دیدگاه‌های پزشکان و جامعه‌ای است که با موارد مشکل اخلاقی مواجه می‌شود. در واقع، پزشکان می‌باید به نحوی کار کنند که بتوانند همراه با تعهد علمی به عقاید اخلاقی و مسؤولیت‌های حرفه‌ای خود، تصمیم‌گیری درستی در امور پزشکی انجام دهند (۱۰). اغلب پزشکان، از ناتوانی روش سنتی در جهت دستیابی به این اهداف نگران هستند (۹)و از این رو، تلاش عمومی جهت بهبود این امر قوت گرفته است. باید توجه داشت که اصلاح موارد عملی در زمینه‌ی اخلاق پزشکی زیاد دشوار نیست و تحول ساختاری در این زمینه می‌تواند، هم به سود حرفه‌ی پزشکی و هم به سود بیمارانی باشد که جهت درمان به این گروه مراجعه می‌کنند (۱۰).

با توجه به موارد مذکور و این نکته که تا زمان انجام این پژوهش، تا جایی که بررسی کردیم، مطالعه‌ی جامعی در مورد دیدگاه‌های پزشکان در زمینه‌ی اخلاق پزشکی در داخل کشور انجام و یا منتشر نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین نگرش پزشکان جامعه درباره‌ی اخلاق پزشکی انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی در سال ۱۳۹۲ در سطح شهر اصفهان به انجام رسید و جامعه‌ی آماری مورد مطالعه، شامل پزشکان شاغل در سطح شهر اصفهان بود. معیارهای ورود به مطالعه شامل پزشک شاغل در شهر اصفهان و موافقت فرد برای شرکت در مطالعه بود. همچنین مقرر شد، در صورت عدم پاسخ‌گویی صحیح و کامل به سؤالات، مورد از مطالعه خارج شود.

حجم نمونه، با استفاده از فرمول بر آورد حجم نمونه جهت مطالعات شیوع و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد. شیوع آگاهی پزشکان در مورد اخلاق پزشکی، به علت نبود مطالعه‌ی مشابه، به میزان ۰/۵ در نظر گرفته شد و همچنین، با پذیرش میزان خطای ۰/۱، حجم نمونه تعداد ۹۶ نفر برآورد شد که جهت اطمینان بیشتر، ۱۰۰ پزشک مورد مطالعه قرار گرفتند.

روش کار بدین صورت بود که بعد از تصویب پروپوزال، با مراجعه‌ی پژوهشگر به مراکز بهداشتی- درمانی، کلینیک‌های تخصصی و مطب‌های خصوصی

پزشکان، ضمن صحبت با پزشکان و توضیح در مورد اهداف طرح و پس از جلب رضایت آن‌ها برای شرکت در مطالعه، پرسش‌نامه‌ی طرح که شامل اطلاعات عمومی و سؤالات راجع به آگاهی، نگرش و عملکرد پزشک در حیطه‌ی اخلاق پزشکی بود، به آن‌ها تحویل شده، درخواست می‌شد تا نسبت به تکمیل آن اقدام کنند. تکمیل پرسشنامه، بسته به نظر پزشک، در همان روز انجام می‌شد و یا در صورت درخواست مهلت، پژوهشگر در روز بعد جهت اخذ پرسشنامه مراجعه می‌نمود.

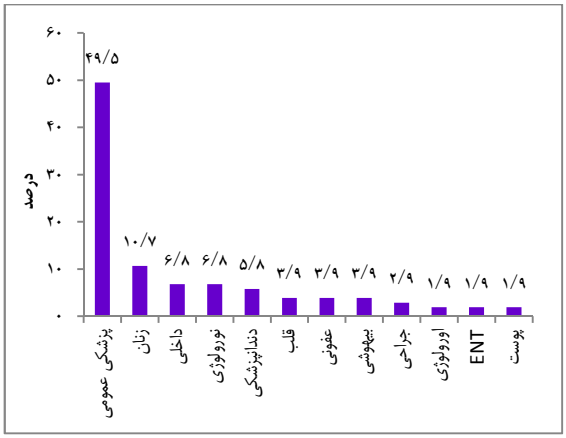
ابزار گردآوری اطلاعات در زمینه‌ی نگرش پزشکان در مورد اخلاق پزشکی، پرسشنامه‌ای محقق‌ساخته مشتمل بر ۱۵ سؤال بود که نحوه‌ی امتیازدهی به هر سؤال در مقیاس Likert به صورت بسیار موافق با امتیاز ۴، موافق با امتیاز ۳، بی‌نظر با امتیاز ۲، مخالف با امتیاز ۱ و بسیار مخالف با امتیاز صفر طبقه‌بندی شد. به منظور تعیین پایایی (Reliability)، پرسشنامه در ابتدا توسط ۲۰ پزشک تکمیل شد و آلفای کرونباخ به میزان ۰/۷۵ به دست آمد؛ پس از اصلاح گزینه‌های اشکال‌دار و تکمیل مجدد پرسشنامه توسط ۱۰ پزشک دیگر، میزان آلفا به ۰/۸۲ رسید. همچنین، جهت اطمینان از روایی پرسشنامه، نظرات استادان درس اخلاق پزشکی در آن لحاظ گردید.

داده‌های مطالعه بعد از جمع‌آوری، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, SPSS Inc., Chicago, IL) و به کار گیری آزمون‌های آماری χ^2، t-student، و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

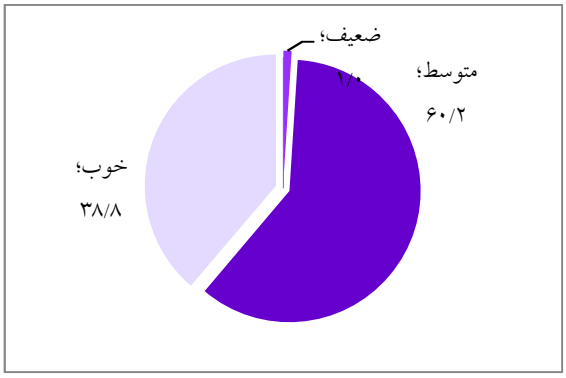
یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۰۳ نفر از پزشکان عمومی، دندان‌پزشکان و پزشکان متخصص شاغل در سطح شهر اصفهان مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. میانگین سن این افراد، ۸/۰ ± ۳۴/۶ سال با دامنه‌ی ۵۵-۲۵ سال بود. ۳۱ نفر (۳۰/۱ درصد) در سن زیر ۳۰ سال، ۴۹ نفر (۴۷/۶ درصد) در سن ۳۹-۳۰ سال و ۲۳ نفر (۲۲/۳ درصد) در سن ۴۰ سال و بالاتر بودند. همچنین، ۵۸ نفر (۵۶/۳ درصد) از شرکت کنندگان، مرد و ۴۵ نفر (۴۳/۷ درصد) زن بودند. ۵۶ نفر (۵۴/۴ درصد) از نمونه‌های مورد مطالعه، پزشکی عمومی و ۴۷ نفر (۴۵/۵ درصد) متخصص بودند. در نمودار ۱، درصد فراوانی نوع تخصص افراد نشان داده شده است.

میانگین نمره‌ی نگرش شرکت کنندگان در زمینه‌ی اخلاق پزشکی برابر ۸/۹ ± ۴۸/۸ با دامنه‌ی ۹۶-۲۸ (از حداکثر نمره‌ی قابل اکتساب ۱۰۰) بود و بر اساس آن، ۱ نفر (۱/۰ درصد) دارای سطح نگرش ضعیف، ۶۲ نفر (۶۰/۲ درصد) دارای سطح نگرش متوسط و ۴۰ نفر (۳۸/۸ درصد) دارای سطح نگرش مطلوب بودند (نمودار ۲).



نمودار ۱. درصد فراوانی رشته‌ی شغلی پزشکان مورد مطالعه



نمودار ۲. درصد فراوانی میزان سطح نگرش پزشکان مورد مطالعه در مورد اخلاق حرفه‌ای

در جدول ۱، میانگین و انحراف معیار نمره‌ی پزشکان مورد مطالعه بر حسب متغیرهای مورد بررسی نشان داده شده است. انجام آزمون‌های χ^2 و دقیق Fisher بر روی داده‌ها نشان داد که نمره‌ی نگرش بر حسب سن اختلاف معنی‌دار داشت و میانگین این نمره، در سنین ۴۰ سال و بالاتر، به طور معنی‌داری بیشتر بود؛ ولی سایر متغیرها نظیر توزیع جنس، مقطع تحصیلی و رشته‌ی شغلی تأثیر معنی‌داری در میانگین نمره‌ی نگرش نداشت.

در جدول ۲، توزیع فراوانی نظرات پزشکان مورد مطالعه در مورد سؤالات مطرح شده در پرسشنامه نشان داده شده است. مطابق این جدول، گزینه‌ی «اکثر پزشکان، تا حد زیادی با مباحث اخلاق پزشکی آشنا هستند» بالاترین موافق را داشت؛ به طوری که ۴/۹ درصد با این گزینه کاملاً موافق و ۵۷/۳ درصد موافق بودند. از طرف دیگر، گزینه‌ی «توجه به اصول ضامن رعایت حقوق بیمار و پزشک می‌باشد»، بیشترین مخالف را داشت؛ به طوری که، ۶۸/۹ درصد پزشکان با این گزینه کاملاً مخالف بودند.

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار نمره‌ی نگرش بر حسب متغیرهای دموگرافیک

متغیر	سطح	میانگین نمره	مقدار P
سن	زیر ۳۰ سال	۵۱/۱ ± ۷/۷	۰/۰۴۸
	۳۰-۳۹ سال	۴۹/۱ ± ۱۰/۰	
	۴۰ سال و بالاتر	۴۵/۱ ± ۶/۹	
جنس	مرد	۴۸/۲ ± ۷/۷	۰/۴۳
	زن	۴۹/۶ ± ۱۰/۴	
مقطع تحصیلی	عمومی	۴۸/۴ ± ۷/۰۹	۰/۶۵
	متخصص	۴۹/۲ ± ۱۰/۸	
رشته‌ی شغلی	دندانپزشکی	۴۹/۱ ± ۴/۵	۰/۰۹
	اورولوژی	۵۱/۳ ± ۰/۹	
	زنان	۴۵/۸ ± ۸/۴	
	داخلی	۵۰/۹ ± ۱۰/۶	
	عمومی	۴۸/۲ ± ۷/۴	
	نورولوژی	۴۶/۷ ± ۴/۶	
	گوش و حلق	۷۲/۰ ± ۳۳/۹	
	قلب	۵۰/۳ ± ۱۰/۵	
	عفونی	۴۷/۳ ± ۹/۸	
	بیهوشی	۴۷/۰ ± ۷/۶	
	پوست	۴۹/۳ ± ۱۱/۳	
	جراحی	۵۴/۲ ± ۱۳/۰	

جدول ۲. توزیع فراوانی (نسبی) نظرات پزشکان در خصوص اصول اخلاق پزشکی

گزینه‌ها	فراوانی نظرات [تعداد(درصد)] کاملاً موافق	موافق	بی‌نظر	مخالف	کاملاً مخالف
توجه به اصول اخلاق پزشکی می‌تواند، اثربخشی اقدامات درمانی را ارتقا دهد.	۲(۱/۹)	۱(۱)	۶(۵/۸)	۴۳(۴۱/۷)	۵۱(۴۹/۵)
توجه به اصول اخلاق پزشکی، ضامن رعایت حقوق بیمار و پزشک می‌باشد.	۱(۱)	۳(۲/۹)	۵(۴/۹)	۲۳(۲۲/۳)	۷۱(۶۸/۹)
توجه به اصول اخلاق پزشکی باعث ارتباط بهتر بیمار و پزشک می‌شود.	۳(۲/۹)	۷(۶/۸)	۳۲(۳۱/۱)	۶۰(۵۸/۳)	۱(۱)
من با مباحث اخلاق پزشکی تا حد زیادی آشنا هستم.	۱(۱)	۲۱(۲۰/۴)	۴۰(۳۸/۸)	۳۶(۳۵)	۵(۴/۹)
من معتقدم رعایت اخلاق پزشکی می‌تواند، اثربخشی اقدامات درمانی را ارتقا دهد.	۰(۰)	۶(۵/۸)	۱۰(۹/۷)	۴۶(۴۴/۷)	۴۱(۳۹/۸)
اکثر پزشکان تا حد زیادی با مباحث اخلاق پزشکی آشنا هستند.	۵(۴/۹)	۵۹(۵۷/۳)	۲۳(۲۲/۳)	۱۴(۱۳/۶)	۲(۱/۹)
در اکثر پزشکان، نگرش مثبتی نسبت به اخلاق پزشکی وجود دارد.	۰(۰)	۲۵(۲۴/۳)	۴۳(۴۱/۷)	۳۳(۳۲)	۲(۱/۹)
از نظر پزشکان، قوانین اخلاق پزشکی باعث محدودیت در آزادی عمل پزشک می‌شود.	۳(۲/۹)	۳۳(۳۲)	۲۵(۲۴/۳)	۳۷(۳۵/۹)	۵(۴/۹)
اخلاق پزشکی فقط در زمینه‌ی تحقیقات و آزمایشات کاربرد دارد.	۴(۳/۹)	۵(۴/۹)	۱۵(۱۴/۶)	۵۷(۵۵/۳)	۲۲(۲۱/۴)
مبانی اخلاق پزشکی منجر به جلوگیری از اعمال غیر قانونی می‌شود.	۳(۲/۹)	۷(۶/۸)	۲۴(۲۳/۳)	۵۳(۵۱/۵)	۱۶(۱۵/۵)
رعایت موازین شرعی در حرفه‌ی پزشکی باید به عنوان شاخه‌ای از اخلاق پزشکی تلقی گردد.	۴(۳/۹)	۸(۷/۸)	۲۲(۲۱/۴)	۴۰(۳۸/۸)	۲۹(۲۸/۲)
یکی از مهم‌ترین وظایف نظام پزشکی، مراقبت از رعایت اخلاق پزشکی است.	۲(۱/۹)	۵(۴/۹)	۱۲(۱۱/۷)	۵۸(۵۶/۳)	۲۶(۲۵/۲)
موازین اخلاق پزشکی در مراکز دولتی بهتر از مراکز خصوصی رعایت می‌شود.	۶(۵/۸)	۴۰(۳۸/۳)	۲۸(۲۷/۲)	۲۲(۲۱/۴)	۷(۶/۸)
لازم است، آموزش اخلاق پزشکی از اولویت‌های بازآموزی پزشکان باشد.	۲(۱/۹)	۹(۸/۷)	۲۲(۲۱/۴)	۵۴(۵۲/۴)	۱۶(۱۵/۵)
آموزش اخلاق پزشکی به دانشجویان، باعث افزایش راندمان سیستم ارایه‌ی خدمات بهداشتی درمانی می‌شود.	۰(۰)	۲(۱/۹)	۱۳(۱۲/۶)	۶۱(۵۹/۲)	۲۷(۲۶/۲)

بحث

هدف کلی از انجام این مطالعه، تعیین نگرش پزشکان جامعه درباره‌ی اخلاق پزشکی بود. طبق نتایج به دست آمده، میانگین نمره‌ی نگرش این افراد در زمینه‌ی اخلاق پزشکی، برابر ۸/۹ ± ۴۸/۸ بود و بر اساس آن، ۱ نفر دارای سطح نگرش ضعیف، ۶۲ نفر دارای سطح نگرش متوسط و ۴۰ نفر دارای سطح نگرش مطلوب بودند.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اکثریت پزشکان، نگرش متوسطی در مورد اصول اخلاق پزشکی دارند؛ این آشنایی و نگرش، در حد مطلوب نیست و می‌تواند در عملکرد آنان نیز اثرگذار باشد. به عبارت دیگر، آشنایی و نگرش مثبت، زمانی کارا خواهد بود که در رفتار پزشک و بیمار تأثیر گذاشته، باعث رعایت اصول آن در حین کار گردد؛ که متأسفانه در کشور ما، با وجود تلاش‌های زیادی که توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و سازمان نظام پزشکی در این زمینه صورت گرفته است، نقطه ضعف‌های فراوانی در آن وجود دارد.

همچنین، میزان خطاهای پزشکی نیز در مراکز درمانی و مطب پزشکان، آمار در خور توجهی دارد (۱۰) که سهل انگاری، کمبود وقت، کمبود تجهیزات و وسایل، کمی دستمزد و... در ایجاد آن دخیل است؛ به طوری که هر روزه، شاهد شکایات متعدد بیماران از پزشکان در زمینه‌ی مسایل مالی و یا قصور پزشکی هستیم.

اهمیت اخلاق پزشکی از دیرباز و حتی از دوران قبل از میلاد، مورد توجه پزشکان و طبیبان قرار داشته است و در این ارتباط، سوگندنامه‌ی بقراط، که یکی از مهم‌ترین اصول آن، به کار بردن نهایت سعی و تلاش در درمان بیمار، بدون توجه به فرقه و نژاد و قومیت و همچنین، رازداری و حفظ اسرار بیماران می‌باشد، نمونه‌ی بارزی می‌باشد؛ امروزه نیز با پیشرفت و توسعه‌ی علوم پزشکی و انجام پژوهش‌ها و تحقیقات متعدد، این مقوله پررنگ‌تر شده و دارای اصول و احکام مدونی گردیده است که پزشکان و پژوهشگران حیطه‌ی پزشکی، چه در زمینه‌ی تحقیقات انسانی و چه در زمینه‌ی تحقیق بر روی حیوانات، ملزم به رعایت آن‌ها می‌باشند.

در کشور ایران، به برکت جاری شدن احکام شرع مقدس اسلام، این رویه بسیار پررنگ‌تر بوده، مقررات مربوط به احکام و اخلاق پزشکی، بسیار گسترده‌تر می‌باشد (۱۱). در مطالعه‌ی ما، حداکثر امتیازی که برای اهمیت این مبحث مد نظر قرار گرفت، امتیاز ۱۰۰ بود که بر اساس نتایج، اهمیت مبحث اخلاق پزشکی از دید پزشکان، ۴۸/۸ درصد به دست آمد؛ این یافته، به منزله‌ی کم‌اهمیت تلقی شدن این مبحث از دید پزشک نیست، بلکه به گزینه‌هایی مربوط می‌گردد که در مطالعه مطرح شده است. به عبارت دیگر تعدادی از پزشکان، به جز گزینه‌های مطرح شده در پرسشنامه، به اصول دیگری معتقد بوده‌اند که در پرسشنامه، قید نشده است.

از طرف دیگر، بررسی تک تک سؤالات مطرح شده در خصوص اهمیت اخلاق پزشکی نشان داد که ارتباط پزشک با بیمار، مهم‌ترین گزینه‌ای است که باید در این مبحث مورد توجه قرار گیرد؛ چنانچه این امر محقق گشته، پزشک و بیمار ارتباطی دوستانه و منطقی داشته باشند، در زمینه‌ی درمان بیماری و همکاری بیمار و خانواده، بسیار کمک کننده خواهد بود. همچنین پزشکان مورد مطالعه، موافقت چندانی با این گزینه که «اخلاق پزشکی منجر به پیش‌گیری از اعمال غیر قانونی می‌شود»، نداشتند؛ در حالی که اخلاق پزشکی، در زمینه‌ی پیش‌گیری از لغزش‌ها و سوء رفتار پزشکی بسیار با اهمیت است.

همچنین، اخلاق پزشکی در زمینه‌ی حقوق بیمار و پزشک نیز دارای اهمیت بالایی می‌باشد که در این مورد نیز نگرش مثبتی وجود نداشت. در مطالعه‌ای که توسط دیبایی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی اهواز انجام گرفت، ۸۲ درصد مصاحبه شوندگان که شامل تعدادی از دانشجویان رشته‌ی پزشکی و تعدادی از پزشکان شاغل بودند، اخلاق پزشکی را یکی از مسایل بسیار با اهمیت دانستند. در آن مطالعه، از میان کل شرکت کنندگان، ۳۳۲ نفر (۸۳/۴ درصد) دانشجو و ۶۶ نفر (۱۶/۵ درصد) دانش‌آموخته بودند. به علاوه، ۲۳۵ نفر از شرکت کنندگان (۵۹ درصد)، زن و ۱۶۳ نفر از آن‌ها (۴۰/۹ درصد)، مرد بودند. به طور کلی، افراد دانش‌آموخته، از نحوه‌ی تدریس و محتوای درسی واحد اخلاق پزشکی رضایت کمتری داشتند و اهمیت این درس را خیلی بیشتر از دانشجویان درک کرده بودند. بیشتر شرکت کنندگان دانشجو (۵۳ درصد)، دوره‌ی کارورزی را دوره‌ی مناسب برای تدریس این درس می‌دانستند؛ که در مورد افراد دانش‌آموخته، این نسبت به طور متمایزتری (۹۳/۹ درصد) وجود داشت و درصد بیشتری از افراد دانش‌آموخته، زمان مناسب برای ارایه‌ی این درس را مقاطع پایانی دوره‌ی تحصیل می‌دانستند (۱۲).

در مطالعه‌ی انجام شده در نیجریه، ۸۸ درصد از دانشجویان پزشکی معتقد به اهمیت و جایگاه ویژه‌ی این مبحث در پزشکی بودند. همچنین ۸۴ درصد این دانشجویان، بر این عقیده بودند که اخلاق پزشکی، در جهت درمان پزشکی مناسب، نقش حیاتی دارد (۱۳).

در مطالعه‌ی Howe و همکاران نیز دانشجویان معتقد بودند که رعایت موازین اخلاق پزشکی، موجبات همراهی بیمار و پزشک و تعامل طرفین در درمان بیماری را فراهم می‌آورد (۱۴).

Huijer و همکاران ۵۰۰ مورد مشکل اخلاقی را که کارورزان با آن مواجه شده بودند، مورد بررسی قرار دادند تا موضوعات لازم جهت آموزش اخلاق پزشکی را مشخص سازند؛ آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که نحوه‌ی برخورد با انواع موارد مشکل اخلاقی باید در برنامه‌ی درسی دانشجویان توسط استادان آموزش داده شود و البته، بر روی موضوعاتی همچون راست‌گویی، پایان زندگی، قصورهای پزشکی و نحوه‌ی انتقال بیمار از یک مراقبت کننده به مراقبت کننده‌ی دیگر، توجه ویژه‌ای مبذول شود (۵).

در نهایت، در بررسی Koh، ۷۷ درصد از دستیاران پزشکی اظهار کرده بودند که حداقل یک بار در سال، با مسایل اخلاقی پیچیده مواجه شده‌اند؛ ۴۴ درصد از آن‌ها نیز بیش از ۲ بار با این موارد روبه‌رو شده بودند (۶).

مواجهه‌ی هرچه بیشتر با مسایل مشکل اخلاقی، موجب تمایل بیشتر دانشجویان به فراگیری رویکردهای اخلاقی ارتباط با بیمار شده است. استادان و برنامه‌ریزان آموزش اخلاق پزشکی در ژاپن توصیه می‌کنند که برنامه‌ی آموزشی مناسب‌تر و فراگیرتری جهت آگاهی پزشکان از موارد مشکل اخلاقی و نحوه‌ی تصمیم‌گیری مناسب آماده گردد؛ آن‌ها همچنین تأکید کرده‌اند که آموزش می‌بایستی به صورت بین گروهی و با همکاری متخصصین اخلاق پزشکی و استادان فلسفه‌ی اخلاق صورت گیرد (۷). میزان تأثیر آموزش بر درک اخلاقی دانشجویان نیز در مطالعه‌ی Holm و همکاران مورد بررسی قرار گرفته است. آنان نشان دادند که دانشجویان پس از گذراندن دوره‌ی اخلاق پزشکی، به وضوح به سطح بالاتری از توانایی استدلال‌های اخلاقی رسیده، درک بهتری نسبت موارد مشکل اخلاقی پیدا می‌کنند (۸).

بنابراین می‌توان گفت که به طور کلی در این مطالعه، پزشکان شاغل نگرش قابل قبولی به محتوای اصول اخلاق پزشکی داشتند ولی سطح نگرش آنان، در مقایسه با مطالعه‌های مورد اشاره، در حد مطلوب نیست. از آن جایی که، یکی از مهم‌ترین راهکارهای ارتقای نگرش پزشکان، اهمیت دادن به درس اخلاق پزشکی در زمان دانشجویی است، پیشنهاد می‌شود تا تغییرات جدیدی در نحوه‌ی تدریس این درس به عمل آید و مبانی کاربردی آن به دانشجویان آموزش داده شود؛ همچنین، با توجه به نظر استادان، ساعات لازم جهت تدریس این درس باید افزایش یابد. به علاوه، باید مقاطع پایانی دوره‌ی تحصیلی رشته‌ی پزشکی به این گونه دروس اختصاص داده شود تا دانشجویان، با انگیزه و نگرش جدی تری نسبت به فراگیری این درس اقدام کنند.

در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، درس اخلاق پزشکی چندین سال است که در درسنامه‌ی آموزش پزشکی قرار گرفته است. با توجه به این که اخلاق پزشکی، یا اخلاق حرفه‌ای، پیش از آن که یک علم باشد، یک مهارت است، بنا به توصیه‌ی علمای آموزش، برای آموزش این مهارت باید از روش‌های

مبتنی بر مهارت (Skill-based) یا روش‌های تجربه‌ای (Experiential) استفاده گردد؛ ولی هنوز روش یکسانی در آموزش این درس دیده نمی‌شود و در بسیاری موارد، از روش‌های تئوریک (Didactic) که توانایی ایجاد مهارت لازم را ندارد، استفاده می گردد. به طور کلی، در دانشگاه‌های مختلف، نظرات متفاوتی در زمینه‌ی محتوای این درس و روش اجرای آن در بین استادان وجود دارد و به روش های گوناگونی ارایه می‌گردد که به نظر می‌رسد، تجدید نظر و یکسان سازی آن بایستی در برنامه‌های آتی سیاست‌گذاران آموزشی مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای مریم قاسمی به شماره‌ی ۳۹۲۴۴۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب شده و با حمایت‌های بی‌دریغ این معاونت، به انجام رسیده است؛ نویسندگان مقاله از زحمات و حمایت‌های این معاونت، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Lovett LM, Seedhouse D. An innovation in teaching ethics to medical students. Medical Education 1990; 24(1): 37-41.
2. Schneider GW, Snell L. C.A.R.E.: an approach for teaching ethics in medicine. Soc Sci Med 2000; 51(10): 1563-7.
3. Charon R, Fox RC. Critiques and remedies: medical students call for change in ethics teaching. JAMA 1995; 274(9): 767, 771.
4. Martinez SA. Currents in contemporary ethics. J Law Med Ethics 2002; 30(3): 452-4.
5. Huijer M, van LE, Boenink A, Kimsma G. Medical students' cases as an empirical basis for teaching clinical ethics. Acad Med 2000; 75(8): 834-9.
6. Koh Y. Residents' preparation for and ability to manage ethical conflicts in Korean residency programs. Acad Med 2001; 76(3): 297-300.
7. Asai A, Kishino M, Fukui T, Masano T. Postgraduate education in medical ethics in Japan. Med Educ 1998; 32(1): 100-4.
8. Holm S, Nielsen GH, Norup M, Vegner A, Guldmann F, Andreasen PH. Changes in moral reasoning and the teaching of medical ethics. Med Educ 1995; 29(6): 420-3.
9. Ministry of Health and Medical Education. Medical ethics and brief of history of medicine. Tehran, Iran: Sepehr Publications; 1991. [In Persian].
10. Larijani MB. Physician and ethical considerations. Tehran, Iran: Baray-e-Farda Publication; 2004. [In Persian].
11. Esmaeeli Yazdi A. Culture of ethics. Qom, Iran: Jamkaran Mosque Publications; 1983. [In Persian].
12. Dibaei A, Saadati N. Evaluating the attitudes of medical students and graduates to medical ethics courses in Ahwaz University of Medical Sciences in 2006-2007. Medical Ethics 2009; 3(7): 111-39. [In Persian].
13. McDonald C, Nijhof A. Beyond codes of ethics: an integrated framework for stimulating morally responsible behaviour in organisations. Leadership & Organization Development Journal 1999; 20(3): 133-47.
14. Howe KR. Medical students' evaluations of different levels of medical ethics teaching: implications for curricula. Med Educ 1987; 21(4): 340-9.

Journal of Isfahan Medical School Received: 18.12.2014

Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015 Accepted: 01.03.2015

Evaluation of Physicians' Attitude about Medical Ethics

Ghodratollah Momeni PhD[1], Neda Yavari MD[2], Maryam Ghasemi[3]

Original Article

Abstract

Background: One of the most important fields in medicine is medical ethics. This study aimed to evaluate the attitude to medical ethics among physicians to determine weak and strength points in this statement and to improve it.

Methods: In a cross-sectional study, 103 physicians were selected from Isfahan areas, Iran, and their attitude about medical ethics was evaluated via a special questionnaire. Finally, the data were analyzed using SPSS software.

Findings: The mean ± SD of attitude score in studied population was 48.4 ± 8.9 (rang: 28-96) from the maximum score of 100. 1 physician (1%) had weak attitude, 62 (61.2%) had moderate attitude and 40 (38.8%) had good attitude about medical ethics.

Conclusion: According to our findings, physicians' attitude about medical ethics is not acceptable and some strategies must be done for improvement of this attitude, especially among medical students.

Keywords: Medical ethic, Attitude, Physician

Citation: Momeni Gh, Yavari N, Ghasemi M. **Evaluation of Physicians' Attitude about Medical Ethics.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 242-51

1- Assistant Professor, Department of Islamic Knowledge, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- General Practitioner, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ghodratollah Momeni PhD, Email: gh_momeni@mail.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵

بیان miR-148a در تومورهای منتژیومای انسانی

مهدیه مودی[۱]، دکتر مجید خیراللهی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تومورهای منتژیوما از شایع‌ترین تومورهای مغزی هستند که از لایه‌ی منتژ منشأ می‌گیرند. اگرچه درصد زیادی از انواع منتژیوما خوش خیم هستند و شمار معدودی از تغییرات ژنتیک دارند، با این حال موقعیت داخل جمجمه‌ای آن‌ها اغلب منجر به پیامدهای جدی و مرگ‌بار می‌شود. به دنبال کشف نقش پروتئین Phosphatase and tensin homolog (PTEN)، به عنوان یک مهارکننده‌ی تومور در منتژیوما که یکی از اهداف miR-148a می‌باشد و از آن جایی که این میکروRNA در بررسی نمونه‌های تومور مغزی با تکنیک Microarray افزایش بیان نشان داده بود، در این مطالعه به ارزیابی الگوی بیان این میکروRNA در منتژیوما پرداختیم.

روش‌ها: ما الگوی بیان miR-148a را بین ۲۵ نمونه‌ی بافتی منتژیوما و چهار نمونه‌ی طبیعی با استفاده از تکنیک Real-time polymerase chain reaction بررسی کردیم.

یافته‌ها: سطح بیان miR-148a بین نمونه‌های بافتی منتژیوما و نمونه‌ی طبیعی تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: از آن جایی که تفاوت معنی‌داری در بیان miR-148a با بافت طبیعی وجود دارد، با انجام بررسی‌های بیشتر شاید بتوان miR-148a را به عنوان یک نشانگر در تومورهای منتژیوما مطرح نمود.

واژگان کلیدی: منتژیوما، بیان miR-148a، Real-time polymerase chain reaction

ارجاع: مودی مهدیه، خیراللهی مجید. **بیان miR-148a در تومورهای منتژیومای انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۵۲-۲۵۷

مقدمه

منتژیوما یک مجموعه‌ی متنوع از تومورهای مغزی ناشی از منتژ می‌باشد؛ منتژ نیز، خود جزء لایه‌های احاطه کننده‌ی سیستم اعصاب مرکزی است. تومورهای خوش‌خیم منتژیومای تشخیص داده شده مسؤول حدود ۳۳/۸ درصد از همه‌ی تومورهای مغزی در طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۶ در ایالت متحده‌ی امریکا بوده است. منتژیوما بر اساس سیستم طبقه‌بندی WHO (World Health Organization) به سه کلاس تقسیم‌بندی می‌شود (۱).

اگر چه نزدیک به ۹۰ درصد موارد منتژیوما خوش‌خیم و همراه با نقایص ژنتیکی محدود است، اما موقعیت داخل جمجمه‌ای آن اغلب منجر به نتایج جدی و مرگ‌بار می‌شود. همچنین، میزان بقا در این

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیرواگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیراللهی

Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

بیماران کمتر از افراد طبیعی است. به عنوان مثال در فنلاند، آنالیز میزان بقا از یک گروه ۱۹۸۶ نفری در بین سال‌های ۱۹۵۳ تا ۱۹۸۴ نشان داد که متوسط ۱۰ سال بقا در بیماران، نسبت به شاهد سالم، ۸۶ درصد است (۲).

در مواردی که تومور بدون مشکل باشد، معاینه و انجام MRI (Magnetic resonance imaging) و سی‌تی اسکن توصیه می‌شود و در موارد علامت‌دار، جراحی انجام می‌گردد. گاهی نمونه‌برداری و جراحی، به دلیل موقعیت حساس تومور، امکان‌پذیر نیست و تنها، رادیوتراپی قابل انجام می‌باشد. به همین دلیل، استفاده از درمان‌های غیرتهاجمی، امروزه به عنوان یک روش جدید مطرح است. تماس با پرتوها، جنسیت و جهش‌های ژنتیک از جمله فاکتورهای مؤثر در منتژیوما هستند. استعداد ارثی به منتژیوما، هم به وسیله‌ی تاریخچه‌ی خانوادگی، و هم به واسطه‌ی ژن‌های کاندید در مسیر ترمیم DNA تأیید شده است (۱).

علاوه بر این ژن‌ها، دسته‌ی دیگری از ژن‌ها به نام میکروRNAها نیز در تومورزایی این نوع از سرطان‌ها نقش دارد (۳). میکروRNAها، مولکول‌های کوچک غیر کدکننده‌ی RNA هستند که بیان ژن‌ها را از طریق اتصال به ناحیه‌ی 3'UTR از mRNA تنظیم می‌کنند (۵-۴). حدود ۳ درصد از ژن‌های انسانی، میکروRNAها کد می‌کند و بیش از ۳۰ درصد پروتئین انسانی به وسیله‌ی میکروRNAها تنظیم می‌شود. میکروRNAها، نقش کلیدی در فرایندهای بیولوژیک شامل تکثیر، تمایز و آپوپتوز دارد. یک میکروRNA ممکن است ژن‌های هدف غیروابسته‌ی گوناگونی را تنظیم کند و به موجب آن، فعالیتهایی نظیر تکثیر سلولی یا آپوپتوز را کنترل نماید. بدین ترتیب، احتمال می‌رود میکروRNAها در بیماری‌های انسانی نظیر سرطان‌ها نقش داشته باشد (۶).

نقش میکروRNAها در سرطان‌ها از مدت‌ها پیش تأیید شده است. به عنوان مثال، در یک مطالعه نشان داده شد که الگوی بیان ۱۴ میکروRNA در منتژیوما نسبت به بافت طبیعی به طور معنی‌داری تغییر می‌کند (۴).

بعد از اثبات نقش میکروRNAها در سرطان، محققان به دنبال شناسایی سایر میکروRNAها بودند تا شاید بتوان، به عنوان پتانسیل تشخیصی- درمانی از آن‌ها استفاده کرد. هم‌اکنون، میکروRNAهای زیادی به عنوان انکوژن و یا ژن سرکوبگر تومور شناخته شده و بعضی از آن‌ها به عنوان بیومارکر سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۷).

miR-148a بر روی بیان PTEN (Phosphatase and tensin homolog)، یک مهار کننده‌ی تومور که به خوبی مطالعه شده است، تأثیر دارد (۸) و مطالعات نشان داده است که PTEN در منتژیوما درگیر است (۹). این میکروRNA در تومورهای مغزی نیز دارای نقش می‌باشد (۱۴-۱۰). به عنوان مثال، در بررسی نقش بیان miR-148a در میزان بقای بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما، طی آنالیز آماری داده‌های ۲۲۰ بیمار مبتلا مشخص شد که miR-148a در آن نمونه‌ها نسبت به بافت سالم مغز افزایش بیان داشت و نیز بیان افزایش یافته‌ی این میکروRNA بر بقای بیماران مؤثر بود (۱۵). علاوه بر این، مشخص شد که این یافته‌ها می‌تواند برای درک بهتر مکانیسم گلیوماژنز و تشخیص زودرس بیماران با خطر بالا به کار رود.

همچنین، miR-148a از جمله‌ی میکروRNAهایی است که به عنوان بیومارکر شناخته می‌شوند. به عنوان

مثال، Chen و همکاران الگوی بیان دو میکروRNA شامل 148a و 152 را در ۱۰۱ نمونه‌ی توموری معده و روده (Gastrointestinal) با روش Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) بررسی کردند و یافته‌های آن‌ها نشان داد که میزان بیان miR-148a به طور معنی‌داری نسبت به بافت طبیعی مجاور خود کاهش می‌یابد (۱۶). همچنین، آن‌ها نشان دادند که این میکروRNA در کارسینوژنز تومورهای معده و روده نقش دارد و کاهش بیان آن می‌تواند به عنوان بیومارکر به کار رود.

بنابراین، با توجه به بیان این میکروRNA در تومورهای مغزی گلیوما (۱۸-۱۷، ۱۳) و نقش احتمالی آن در منتژیوما، در این مطالعه برای اولین بار، تصمیم به بررسی بیان این میکروRNA با تکنیک RT-PCR در ۲۵ تومور مغزی منتژیوما و ۴ نمونه‌ی طبیعی گرفته شد.

روش‌ها

نمونه‌ها و بیماران: بعد از دریافت رضایت‌نامه‌ی کتبی و رعایت ملاحظات اخلاقی، نمونه‌ها در طول عمل جراحی از ۲۵ نمونه‌ی منتژیوما در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌های طبیعی، از ۴ فرد بدون هیچ شواهدی از سرطان از پزشکی قانونی اصفهان به دست آمد. قابل ذکر است که نمونه‌های طبیعی از افرادی که دو ساعت قبل مرده بودند، گرفته شد. در آخر، نمونه‌ها از نظر پاتولوژی به عنوان منتژیوما تشخیص داده شد.

جداسازی RNA از نمونه‌ها و سنتز cDNA: نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰ °C تا زمان آنالیز ذخیره شد. RNA از نمونه‌های ۱۰ میلی‌گرمی با تکنیک‌های استاندارد استخراج شد. کل RNA با محلول TRIzol (Invitrogen) مطابق پروتکل استخراج، برای نمونه‌های جامد استخراج و در آب بدون RNase، مطابق دستور سازنده‌ی پروتکل حل شد. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت آن با روش‌های UV (Ultraviolet) اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شد.

پس از استخراج، ۲ میکرولیتر RNA کل با استفاده از miRCURY LNA™ microRNA PCR (cDNA synthesis kit) به cDNA تبدیل شد.

RT-PCR: به دنبال سنتز cDNA، RT-PCR با کیت ExiLENT SYBR® Green master mix انجام پذیرفت. از پرایمر u6 برای نرمالیزه کردن داده‌ها استفاده شد. برای هر واکنش نیز سه بار تکرار گذاشته شد.

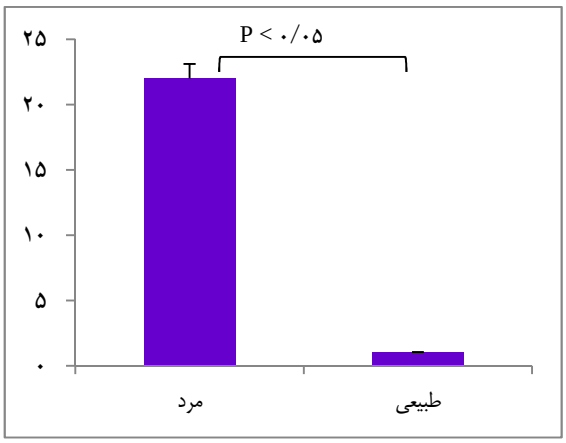
آنالیز آماری: پس از اتمام واکنش، با استفاده از نرم‌افزار دستگاه RT-PCR، بیان میکروRNAها به صورت کمی استحصال شد و آنالیزهای آماری توسط متخصص آمار به منظور مقایسه‌ی میانگین بیان نسبی miR-148a در دو گروه توموری منتژیوما و طبیعی و نیز در درجه‌های مختلف از این تومور، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۵ نمونه‌ی تومور مورد بررسی قرار گرفت که ۷ مورد متعلق به مردان و ۱۸ مورد متعلق به زنان بود. مینگین سن افراد ۰/۵۷ ۵۴/۰۰ با بازه‌ی ۸۱-۱۶ سال به دست آمد.

همچنین از نظر Staging، ۱۹ بیمار در درجه‌ی ۱، ۴ بیمار در درجه‌ی ۲ و ۲ بیمار در درجه‌ی ۳ بیماری بودند.

در بررسی بیان miR-148a در نمونه‌های مننژیوما، نتایج مقاسه‌ی بیان این میکروRNA در ۲۵ نمونه‌ی مننژیوما نسبت به ۴ نمونه‌ی سالم حاکی از افزایش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در نمونه‌های مننژیوما نسبت به نمونه‌های طبیعی بود (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه‌ی الگوی بیان miR-148a در نمونه‌های مننژیوما نسبت به نمونه‌های طبیعی

بحث

بعد از اثبات نقش میکروRNAها در سرطان، محققان به دنبال شناسایی سایر میکروRNAها بودند تا شاید بتوان به عنوان پتانسیل تشخیصی- درمانی از آن‌ها استفاده کرد. هم‌اکنون، میکروRNAهای زیادی به عنوان انکوژن و یا ژن سرکوبگر تومور و یا حتی بیومارکر سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۷). به عنوان مثال، miR-148a از جمله میکروRNAهایی است که در سرطان معده به عنوان بیومارکر شناخته شده است (۱۶).

به تازگی، پروتئین PTEN به عنوان مهار کننده شناخته شده است. جهش‌های سوماتیک در این ژن در طیف وسیعی از سرطان‌ها، نظیر گلیوبلاستوما، یافت شده است. همچنین، جهش‌های رده‌ی زایای این ژن در بیماران Cowden، که مستعد به مننژیوما هستند، نیز دیده شده است. بنابراین، این ژن به عنوان پروتئین دارای نقش احتمالی در مننژیوما مطرح است (۱۹).

این ژن دارای جایگاه‌های اتصال برای مجموعه‌ای از میکروRNAها شامل miR-148a می‌باشد. نشان داده شده است که miR-148a در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما نسبت به افراد سالم افزایش بیان دارد و نیز، بیان افزایش یافته‌ی این میکروRNA بر بقای بیماران مؤثر است. ضمن این که این یافته‌ها را می‌توان برای درک بهتر مکانیسم گلیوماژنز و تشخیص زودرس بیماران با ریسک بالا به کار برد (۱۵).

Huse و همکاران نقش میکروRNAها را در تنظیم بیان انکوژن‌ها در سه نمونه‌ی بافتی گلیوبلاستوما با روش Microarray بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این میکروRNA افزایش بیان ۱۲/۳ برابری نسبت به نمونه‌ی طبیعی داشت. همچنین، آن‌ها نشان دادند که ژن PTEN، که یک مهار کننده‌ی تومور است، می‌تواند یکی از اهداف مهم این میکروRNA باشد (۱۷).

از آن جایی که بیان miR-148a در نمونه‌های مغزی گلیوما با تکنیک Microarray افزایش بیان نشان داده بود و با توجه به نقش PTEN در مننژیوما و این که این پروتئین از اهداف miR-148a می‌باشد، ما بیان این میکروRNA را در ۲۵ نمونه‌ی خوش‌خیم مننژیوما بررسی کردیم. نتایج آنالیز ما نشان داد که بیان miR-148a هم‌خوان با داده‌های Microarray افزایش معنی‌داری در نمونه‌های بافتی مننژیوما نسبت

به نمونه‌ی طبیعی داشت.

به عنوان نتیجه، از آن جایی که تفاوت معنی‌دار در بیان miR-148a با بافت طبیعی وجود دارد، با انجام بررسی‌های بیشتر شاید بتوان miR-148a را به عنوان یک نشان‌گر در تومورهای مننژیوما مطرح نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مهدیه مودی به شماره‌ی پایان نامه‌ی ۳۹۲۴۶۷ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. با تشکر از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، که بودجه‌ی انجام این تحقیق را تأمین نمود.

References

1. Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. J Neurooncol 2010; 99(3): 307-14.
2. Raizer J. Meningiomas. Curr Treat Options Neurol 2010; 12(4): 360-8.
3. Zhi F, Zhou G, Wang S, Shi Y, Peng Y, Shao N, et al. A microRNA expression signature predicts meningioma recurrence. Int J Cancer 2013; 132(1): 128-36.
4. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009; 136(2): 215-33.
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116(2): 281-97.
6. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol 2007; 23: 175-205.
7. Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogrodowski P, et al. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. Genes Dev 2009; 23(24): 2806-11.
8. Yuan K, Lian Z, Sun B, Clayton MM, Ng IOL, Feitelson MA. Abstract C16: miR-148a regulates the expression of PTEN in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. Cancer Research 2011; 71(18 Suppl): C16.
9. Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B, Hayashi Y, Meyer-Puttlitz B, Duerr EM, et al. Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. Neuropathol Appl Neurobiol 1998; 24(1): 3-8.
10. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2010; 28(10): 1721-6.
11. Brenner WG, Romanov GA, Kollmer I, Burkle L, Schmulling T. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. Plant J 2005; 44(2): 314-33.
12. Becanovic K, Pouladi MA, Lim RS, Kuhn A, Pavlidis P, Luthi-Carter R, et al. Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. Hum Mol Genet 2010; 19(8): 1438-52.
13. Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, et al. A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. J Neurochem 2011; 118(3): 449-57.
14. Liu TP, Zeng Y. Large time behavior of solutions for general quasilinear hyperbolic-parabolic systems of conservation laws (Memoirs of the American Mathematical Society). Providence, RI: American Mathematical Society; 1997.
15. Srinivasan S, Patric IR, Somasundaram K. A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma. PLoS One 2011; 6(3): e17438.
16. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. J Gastrointest Surg 2010; 14(7): 1170-9.
17. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. Genes Dev 2009; 23(11): 1327-37.
18. Rao SA, Santosh V, Somasundaram K. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. Mod Pathol 2010; 23(10): 1404-17.
19. Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH, Simon M, Schramm J, Wiestler OD, et al. Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. Int J Cancer 2001; 94(2): 218-21.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 06.12.2014
Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015
Accepted: 16.03.2015

Expression of miR-148a in Human Meningioma Tumors

Mahdiyeh Moodi MSc[1], Majid Kheirollahi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Meningioma is one of the most prevalent brain tumors and is derived from meninges. Although, the tumor is usually benign and has limited numbers of genetic aberrations, but intracranial location often cause serious and lethal outcomes. Following role of phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein, a tumor suppressor gene that is one of miR-148a targets in meningioma and as the microRNA has showed up regulation in brain tumor samples in microarray data, we assessed miR-148a expression pattern in meningioma.

Methods: We evaluated miR-148a expression among 25 meningioma and 4 normal tissues using real-time polymerase chain reaction method.

Findings: The expression level of miR-148a showed significant difference between meningioma and normal tissues ($P < 0.05$).

Conclusion: As a result, since there is a significance difference in the miR-148a expression in meningioma tumors compared to normal tissues, the microRNA might be considered as a marker in meningiomas tumors, with further investigations.

Keywords: Meningioma, miR-148a expression, Real-time polymerase chain reaction

Citation: Moodi M, Kheirollahi M. **Expression of miR-148a in Human Meningioma Tumors.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 252-7

1- Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Diseases AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Diseases AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Majid Kheirollahi, Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۸

مقایسه‌ی سه روش مختلف اندازه‌گیری HbA1c با روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

دکتر آذر برادران[۱]، دکتر آزاده کرمی[۲]

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: شیوع جهانی دیابت شیرین به سرعت در حال افزایش است. اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله، بیشتر HbA1c، اساس ارزیابی بیماران مبتلا به دیابت است. HbA1c برای پایش طولانی مدت کنترل قند خون، تنظیم درمان، ارزیابی کیفیت مراقبت از بیمار و پیش‌گویی خطر ایجاد عوارض به کار می‌رود. از آن جایی که HbA1c روش استاندارد برای کنترل طولانی مدت قند خون در مبتلایان به دیابت است، روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری آن وجود دارد و همه‌ی آزمایشگاه‌ها از روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography یا HPLC) استفاده نمی‌کنند. هدف این مطالعه، مقایسه‌ی سه روش متفاوت با روش HPLC بود تا ببینیم کدام روش، هم‌خوانی و همبستگی قابل قبولی با روش مرجع دارد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۵۸ بیمار مبتلا به دیابت مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ی خون هر بیمار با دستگاه‌های Diazyme (روش آنزیماتیک)، Nycocard (Boronate-affinity binding) و Biosystem (کروماتوگرافی ستونی) برای اندازه‌گیری مقدار HbA1c چک شد و مقدار HbA1c هر دستگاه با جواب Knauer-HPLC مقایسه شد.

یافته‌ها: میانگین فاصله مقادیر در آزمون ANOVA برای Nycocard-HPLC برابر ۱/۸ با انحراف معیار ۱/۰۹، برای Biosystem-HPLC مساوی ۱/۵ با انحراف معیار ۱/۰۸ و برای Diazyme-HPLC برابر ۱/۳ با انحراف معیار ۱/۲ به دست آمد. ضریب همبستگی Pearson بین HPLC و Nycocard مساوی ۰/۷۶، بین Diazyme و HPLC برابر ۰/۷۵ و بین Biosystem و HPLC مساوی ۰/۶۸ به دست آمد. معادله‌ی خط Regression برای هر روش با HPLC نیز به دست آمد.

نتیجه‌گیری: از بین این روش‌ها، Diazyma عملکرد بهتری نسبت به دو روش دیگر داشت و همبستگی بیشتری نشان داد؛ هر چند، جایگزین مطلوبی برای HPLC نیست.

واژگان کلیدی: HbA1c، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روش آنزیمی، کروماتوگرافی ستونی، دیابت

ارجاع: برادران آذر، کرمی آزاده. **مقایسه‌ی سه روش مختلف اندازه‌گیری HbA1c با روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۶۶-۲۵۸

مقدمه

اختلالات تنظیم متابولیک همراه دیابت، منجر به تغییرات پاتوفیزیولوژیک ناشی از هیپرگلیسمی در سیستم‌های مختلف بدن می‌شود (۳-۱). از آن جایی که عوارض دیابت شیرین با کنترل قند خون مرتبط است، نرموگلیسمی هدف مطلوب برای بیشتر بیماران

۱- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دستیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر آذر برادران
Email: azarbaradaran@yahoo.com

است (۷-۲). اندازه‌گیری HbA1c استاندارد طلایی برای کنترل طولانی مدت قند خون در افراد مبتلا به دیابت شیرین است (۱۴-۸). روش‌های گوناگونی برای اندازه‌گیری گلیکوهموگلوبین وجود دارد (۱۵) و اختلاف زیادی بین مقادیر گزارش شده از روش‌های مختلف مشاهده می‌شود که مقایسه‌ی نتایج این روش‌ها را مشکل می‌سازد (۱۷-۱۲). به علاوه، روش‌های مختلف تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی نظیر انواع کم خونی، بارداری، اسپلنکتومی، ترانسفوزیون و مصرف دارو (سالسیلات) قرار می‌گیرد (۱۸، ۳، ۱). روش اقتصادی، روشی است که دقیق، سودمند، خودکار و با کاربری آسان باشد (۱۸).

روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC یا High-performance liquid chromatography) به عنوان روش مرجع برای استانداردسازی سایر روش‌های معمول به کار می‌رود و صحت، دقت و پایداری طولانی مدت دارد (۲۰-۱۹)؛ ضمن این که مشخص شده است، کالیبراسیون بر اساس روش HPLC، قابلیت مقایسه‌ی بین روش‌های مختلف را افزایش می‌دهد (۲۱-۱۸).

بسیاری از متخصصین، از عدم هم‌خوانی جواب‌های HbA1c به دست آمده از روش‌های مختلف با وضعیت بیماران و تفاوت قابل توجه برخی از آن‌ها با مقادیر روش مرجع (HPLC) ناراضی هستند (۲۸-۲۲). از طرفی، دستگاه HPLC گران است، کار کردن با آن، مشکل و وقت‌گیر می‌باشد و پرسنل کارآزموده می‌طلبد؛ تهیه‌ی آن برای همه‌ی آزمایشگاه‌ها مقرون به صرفه نیست و از طرفی بیماران مبتلا به دیابت نیاز به چک مداوم HbA1c دارند و بسیاری از آن‌ها قادر به پرداخت هزینه‌ی انجام آزمایش به روش HPLC نیستند.

در این مطالعه، تصمیم گرفتیم تا اندازه‌گیری HbA1c با دستگاه‌های Diazyme (روش آنزیماتیک)، Nycocar (Boronate-affinity binding) و Biosystem (کروماتوگرافی ستونی) را با روش HPLC مقایسه کنیم تا ببینیم، جواب‌های کدام روش هم‌خوانی و همبستگی بیشتری با جواب‌های HPLC دارد، تا به عنوان روش جایگزین در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، تحلیلی از نوع همبستگی و آینده‌نگر بود. نمونه‌گیری به صورت آسان (Simple sampling) بر روی افراد مبتلا به دیابت مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان الزهرای (س) اصفهان در سال ۱۳۸۹، بر اساس یک پرسشنامه و فرم رضایت‌نامه صورت گرفت. معیارهای خروج از مطالعه شامل بارداری، سابقه‌ی اسپلنکتومی (برداشت طحال)، هرگونه کم خونی، انتقال خون طی ۳ ماه گذشته و مصرف داروهای سالسیلات بود. در نهایت، ۵۸ بیمار مبتلا به دیابت (۳۱ نفر زن و ۲۷ نفر مرد) انتخاب شدند.

پس از خون‌گیری وریدی از هر بیمار (ناشتا) به میزان ۸ سی‌سی، خون در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری شد. ۶ سی‌سی از خون جهت اندازه‌گیری HbA1c با دستگاه‌های Diazyme، Nycocard و Biosystem به بخش فنی آزمایشگاه بیمارستان الزهرا (س) فرستاده شد و مابقی، پس از جمع‌آوری، در یخچال نگهداری شد. سپس، درون ظرف مخصوص

حمل نمونه و Ice-bag، به آزمایشگاهی دیگر جهت اندازه‌گیری با HPLC فرستاده شد. پس از کالیبره کردن هر دستگاه و دادن نمونه‌های کنترل کیفی به آن، در شرایط یکسان، میزان HbA1c خون بیماران توسط هر دستگاه، جداگانه اندازه‌گیری گردید. میزان خطای کلی مجاز ما برای هر روش، ۴ درصد بود که زیر میزان مجاز (۴/۳ درصد) بر اساس نظریه Biological variation می‌باشد (۲۲).

جهت مقایسه‌ی میانگین فاصله‌ی مقادیر به دست آمده از هر سه روش با مقادیر HPLC، از آزمون آنالیز واریانس و برای بررسی همبستگی بین مقادیر به دست آمده از هر سه روش با مقادیر HPLC، از آزمون همبستگی Pearson و آنالیز Regression استفاده شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵/۵ (version 15.5, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.

در ادامه توضیحاتی در مورد دستگاه‌های مورد استفاده در این مطالعه ارایه می‌شود.

Knauer-HPLC: ساخت شرکت Advanced scientific instruments آلمان، دستگاهی است که بر پایه‌ی کروماتوگرافی تمایلی با کارایی بالا ساخته شده است. نمونه‌ی مورد نیاز ۴ میکرولیتر خون کامل است که پس از افزودن محلول لیز، سانتریفیوژ انجام گرفته، مایع رویی برای تزریق به داخل دستگاه به کار می‌رود. انجام هر آزمون، حدود ۳۰ دقیقه طول می‌کشد و پرسنل کارآزموده می‌طلبد.

Nycocard: دستگاهی کوچک با یک کیت و Nycocard reader است و اساس تست، Boronate-affinity binding می‌باشد. نمونه‌ی خون کامل، طبق دستور کیت با معرف‌ها ترکیب و محصول نهایی بر روی یک Test device ریخته می‌شود. سپس محلول شستشو اضافه و در نهایت، با استفاده از Nycocard reader نتیجه خوانده می‌شود. کار کردن با آن راحت است و زمان هر تست، ۱۰ دقیقه می‌باشد.

Biosystem: یک کیت که محتوی ستون‌های کروماتوگرافی به همراه معرف‌ها می‌باشد و در دمای اتاق باید استفاده شود، اساس تست کروماتوگرافی تعویض یونی- اسپکتروفتومتری است. طبق دستور کیت، معرف‌ها به همراه یک ستون برای هر نمونه به کار برده می‌شود و در انتها، مایع شسته شده از ستون که جزء HbA1c است، جمع‌آوری می‌گردد. در لوله‌ی آزمایش دیگری، همولیزات و یک معرف را ترکیب می‌شود تا هموگلوبین تام به دست آید. سپس، جذب نوری هر دو با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. این روش، بسیار وقت گیر است (حدود یک ساعت)، شرایط دمایی باید رعایت شود و دقت فراوان در انجام آن لازم است.

Diazyme: کیت حاوی معرف‌ها و بافرها بوده، برای استفاده در اتوآنالیزرها ساخته شده است و اساس تست، واکنش‌های آنزیمی می‌باشد. خون کامل طبق دستور کیت، با محلول لیز مخلوط شده، پس از مدت کوتاه در اتوآنالیزر قرار می‌گیرد و جذب نوری نمونه، با اتوآنالیزر در طول موج ۴۳۰ نانومتر محاسبه می‌شود. نتیجه به صورت مستقیم و با درصد بیان می‌گردد. این تست بسیار راحت و کار کردن با آن آسان است و زمان انجام هر تست، ۱۵ دقیقه می‌باشد.

لازم به ذکر است که هر ۴ روش مورد استفاده در این تحقیق، قابل رد یابی (Traceable) به

استانداردهای DCCT/NGSP می‌باشد.

یافته‌ها

مقادیر HbA1c به دست آمده از هر ۴ روش، شامل حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف معیار، در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. مقادیر HbA1c به دست آمده از روش‌های مختلف

روش اندازه‌گیری	مقدار HbA1c	
	میانگین ± انحراف معیار	حداکثر - حداقل
HPLC	۵/۸ ± ۱/۴	۳/۴-۱۰/۸
Nycocard	۷/۶ ± ۱/۸	۵/۳-۱۴/۴
Biosystem	۷/۲ ± ۱/۸	۵/۰۱-۱۴/۳
Diazyme	۷/۰ ± ۲/۱	۴/۹-۱۶/۲

HPLC: High-performance liquid chromatography

از بین روش‌های انجام شده میانگین مقادیر حاصل از Diazyme به میانگین HPLC نزدیک‌تر بود. با محاسبه‌ی قدر مطلق اختلاف مقادیر موازی حاصل از هر روش با مقادیر حاصل از روش HPLC، و میانگین آن را محاسبه شد که برای HPLC و Nycocard برابر ۱/۱ ± ۱/۸، برای HPLC و Biosystem معادل ۱/۱ ± ۱/۵ و برای HPLC و Diazyme مساوی ۱/۲ ± ۱/۳ بود. آزمون آنالیز واریانس با مشاهدات تکراری نشان داد که سه میانگین با هم اختلاف آماری معنی‌دار دارند (P < ۰/۰۰۱). کم‌ترین میانگین مربوط به HPLC و Diazyme بود؛ به این معنی که، مقادیر موازی حاصل از Diazyme نسبت به دو روش دیگر به HPLC نزدیک‌تر بوده است.

آزمون همبستگی Pearson نشان داد که بین مقادیر HbA1c به دست آمده از هر روش، با مقادیر حاصل از روش HPLC رابطه‌ی خطی معنی‌داری وجود دارد (P < ۰/۰۰۱). پارامترهای Regression خطی به دست آمده از هر روش نسبت به HPLC نیز همراه با مقدار r محاسبه شده در جدول شماره‌ی ۲ آورده شده است؛ ملاحظه می‌شود که ضریب همبستگی Pearson (r) بین HPLC و Nycocard بیش از دو روش دیگر به عدد ۱ نزدیک می‌باشد. این امر، نشان از همبستگی قوی‌تر بین این دو روش نسبت به روش‌های دیگر است. نمودار Regression خطی نیز در شکل شماره‌ی ۱ به تصویر کشیده شده است.

بحث

طبق آمار، جمعیت مبتلا به دیابت روز به روز در حال افزایش است. عوارض میکروواسکولر دیابت شامل نفروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی، بار عظیمی را بر فرد و سیستم بهداشتی تحمیل می‌کند (۲۵-۲۳). ایجاد این عوارض با قند خون بالای طولانی مدت در بیماران مرتبط است و HbA1c نمایانگر تاریخچه‌ی قند خون طی ۳-۲ ماه گذشته می‌باشد. اندازه‌گیری Hb گلیکولیزه روش استاندارد برای بررسی طولانی مدت کنترل طبیعی در بیماران است (۲۸-۲۵، ۱۲، ۲) و اندازه‌گیری مقادیر حقیقی و درست آن با روش‌های آزمایشگاهی، جهت پی‌گیری و درمان بیماران بسیار حایز اهمیت می‌باشد.

برای مقایسه‌ی مقادیر HbA1c، باید نتایج روش‌های مختلف قابل مقایسه باشد (۱۲، ۲). از آن جایی که استفاده از روش مرجع (HPLC) برای همه‌ی آزمایشگاه‌های بالینی مقرون به صرفه نیست، لزوم یافتن روش‌های جایگزین که جواب‌هایشان تا حد

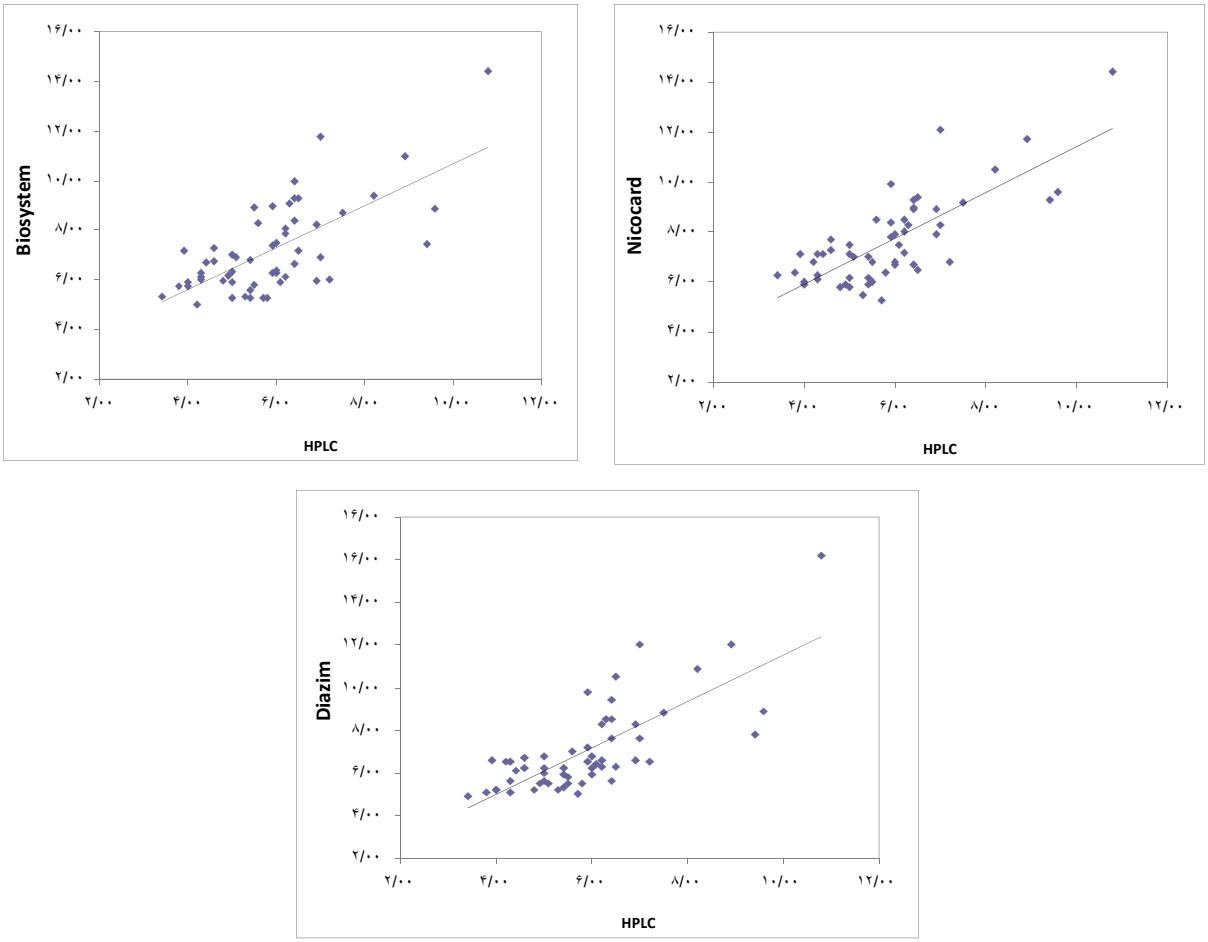
امکان به جواب‌های HPLC نزدیک بوده، همبستگی قوی با آن داشته باشد، مشخص می‌شود. مطالعات متعددی نیز در این زمینه صورت گرفته است.

در مطالعه‌ی Halwachs-Baumann و همکاران، مقایسه‌ای بین روش‌های Roche immunoassay، Variant HPLC و Hi-auto A1C analyze system با روش مرجع Diamat HPLC صورت گرفت که روش Roche immunoassay نزدیک‌ترین میانگین رابه میانگین روش مرجع داشت. ضریب همبستگی هر کدام از روش‌ها با روش مرجع، به ترتیب ۰/۹۷۰، ۰/۹۷۷ و ۰/۹۷۲ بود که هر سه، هم‌خوانی خوبی با روش مرجع نشان داد (۲۹).

جدول ۲. پارامترهای Regression خطی برای $y = ax + b$ و ضریب همبستگی Pearson برای مقایسه‌ی روش‌های اندازه‌گیری HbA1c

y	x	A (شیب خط)	B (عرض از مبدأ)	ضریب همبستگی (r)
Nycocard	HPLC	۰/۹۰۸	۲/۳۱۶	۰/۷۶
Biosystem	HPLC	۰/۸۳۶	۲/۲۹۵	۰/۶۸
Diazyme	HPLC	۱/۰۸۱	۰/۶۸۵	۰/۷۵

HPLC: High-performance liquid chromatography



شکل ۱. نمودار مقایسه‌ی نتایج اندازه‌گیری HbA1c، که توسط سه روش جدید (محور y) در مقابل Knauer-HPLC (محور x) به دست آمده است.

HPLC: High-performance liquid chromatography

در بررسی Turpeinen و همکاران نیز سه دستگاه با یکدیگر مقایسه شد. ضریب همبستگی Pearson بین PolyCAT A (یک HPLC بر اساس کروماتوگرافی ستونی) و Diamat (یک اتوآنالیزر بر اساس کروماتوگرافی تعویض یونی) برابر با ۰/۳۰ ± ۰/۹۰ بود؛ ضریب همبستگی بین PolyCAT A, IMX (بر اساس Boronate-affinity binding) نیز مساوی ۰/۰۴ ± ۰/۸۵ به دست آمد. در این مطالعه، محدودیت‌های Diamat به عنوان یک روش مرجع آشکار شد و محققان متوجه شدند که در شیفت ازیک روش به روش دیگر، احتمال ایجاد مشکلات جدی در پی‌گیری بالینی وجود دارد (۳۰).

Hawkins نیز ۴ روش Point of care را با روش Roche tinaqant مقایسه کرد و ضریب همبستگی Pearson را برای هر ۴ روش Nycocard، DCA 2000، D55 و Diastat بیش از ۰/۹ به دست آورد. از بین این روش‌ها، Diastat و DCA2000 بهترین عملکرد و هم‌خوانی را با روش مرجع نشان دادند و او نتیجه گرفت که این دو روش، جایگزین مناسبی برای یکدیگر و همچنین برای Roche می‌باشند (۳۱). در هیچ کدام از مطالعات بررسی شده، میانگین فاصله‌ی مقادیر هر روش با روش مرجع ارزیابی نشده است (۴۰-۲۹).

در مطالعه‌ی ما، ضریب همبستگی روش‌های Nycocard و HPLC برابر ۰/۷۶ و ضریب همبستگی روش‌های Diazyme و HPLC مساوی ۰/۷۵ برآورد شد ولی در کل، Diazyme عملکرد بهتری نسبت به Nycocard و Biosystem داشت؛ چرا که، میانگین مقادیر آن به میانگین مقادیر HPLC نزدیک‌تر بود و همچنین، نسبت به دو روش دیگر، کم‌ترین میانگین فاصله‌ی مقادیر را با روش HPLC داشت. با این حال، این روش نیز به حد کافی، مطلوب نیست و نمی‌تواند جایگزین روش HPLC باشد؛ چرا که، ضریب همبستگی Pearson این روش با HPLC (۰/۷۵) فاصله‌ی زیادی تا عدد یک دارد و همبستگی آن، عالی نیست.

برای هر سه روش، معادله‌ی Regression خطی به دست آمد که می‌تواند، برای تبدیل مقادیر به دست آمده از هر روش به مقادیر HPLC به کار رود. توصیه می‌شود، مطالعات بیشتری با حجم نمونه‌ی بیشتر و بر روی روش‌ها و دستگاه‌های رایج دیگر در آزمایشگاه بالینی صورت گیرد تا در رفع معضلات موجود در پی‌گیری و درمان بیماران مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح پژوهشی و به صورت پایان‌نامه‌ی دستیاری، در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است.

References

1. Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. J Renal Inj Prev 2013; 2(2): 59-62.
2. Syed IA. Glycated haemoglobin; past, present, and future are we ready for the change. J Pak Med Assoc 2011; 61(4): 383-8.
3. Baradaran A. Lipoprotein(a), type 2 diabetes and nephropathy; the mystery continues. J Nephropathol 2012; 1(3): 126-9.
4. Nazar CMJ. Mechanism of hypertension in diabetic nephropathy. J Nephropharmacol 2014; 3(2): 49-55.

5. Beladi-Mousavi SS, Bashardoust B, Nasri H, Ahmadi A, Tolou-Ghamari Z, Hajian S, et al. The theme of the world diabetes day 2014; healthy living and diabetes; a nephrology view point. J Nephropharmacol 2014; 3(2): 43-5.
6. Assadi F. The epidemic of pediatric chronic kidney disease: the danger of skepticism. J Nephropathol 2012; 1(2): 61-4.
7. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A. On the occasion of world diabetes day 2105; act today to change tomorrow. J Renal Endocrinol 2015; 1: e02.
8. Ardalan MR, Sanadgol H, Nasri H, Baradaran A, Tamadon MR, Rafieian-Kopaei R. Vitamin D therapy in diabetic kidney disease; current knowledge on a public health problem. J Parathy Dis 2014; 2(1):15-7.
9. Nasri H. Comment on: Serum cholesterol and LDL-C in association with level of diastolic blood pressure in type 2 diabetic patients. J Renal Inj Prev 2012; 1(1): 13-4.
10. Hajivandi A, Amiri M. World Kidney Day 2014: Kidney disease and elderly. J Parathyr Dis 2014; 2(1):3-4.
11. Nasri H, Yazdani M. The relationship between serum LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and systolic blood pressure in patients with type 2 diabetes. Kardiol Pol 2006; 64(12): 1364-8.
12. Bryskiewicz ME, Majkowska L. Glycated hemoglobin (HbA1c) as a standard diagnostic criterium for diabetes? Pol Merkur Lekarski 2011; 30(176): 150-4. [In Polish].
13. Nasri H. Association of serum lipoprotein (a) with hypertension in diabetic patients. Saudi J Kidney Dis Transpl 2008; 19(3): 420-7.
14. Bryskiewicz ME, Majkowska L. Aspects of the standardization of glycated hemoglobin (HbA1c) measurement. Pol Merkur Lekarski 2011; 30(176): 155-9. [In Polish].
15. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 2002; 40(1): 78-89.
16. Gaborit B, Nicolay A, Valero R, Begu A, Badens C, Bellanne-Chantelot C, et al. Comparison of performances of various HbA1c methods in Haemoglobin Camperdown variant detection: consequences in diabetes management. Clin Chim Acta 2009; 403(1-2): 262-3.
17. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, Fujimoto EK, Mallia AK, Smith PK, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. Clin Chem 1982; 28(10): 2088-94.
18. John WG. Glycated haemoglobin analyses--assessment of within- and between-laboratory performance in a large UK region. Ann Clin Biochem 1987; 24 (Pt 5): 453-60.
19. Bodor GS, Little RR, Garrett N, Brown W, Goldstein DE, Nahm MH. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. Clin Chem 1992; 38(12): 2414-8.
20. Reinauer H. Biochemistry of protein glycation in diabetes mellitus. Klin Lab 1993; 39: 984-7.
21. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, Little R, England J, Peterson CM. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. Clin Chem 1998; 44(9): 1951-8.
22. Roberts NB, Amara AB, Morris M, Green BN. Long-term evaluation of electrospray ionization mass spectrometric analysis of glycated hemoglobin. Clin Chem 2001; 47(2): 316-21.
23. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. Clin Chem 1994; 40(1): 138-44.
24. Westgard J. Desirable biological variation database specifications [Online]. [cited 2014]; Available from: URL:http://www.westgard.com/biodatabase1.htm.
25. Nasri H, Baradaran A. Association of serum lipoprotein (a) with ultrasonographically determined early atherosclerotic changes in the carotid and femoral arteries in kidney transplanted patients. Transplant Proc 2004; 36(9): 2683-6.
26. Nasri H, Baradaran A. Correlation of serum magnesium with dyslipidemia in maintenance hemodialysis patients. Acta Medica (Hradec Kralove) 2004; 47(4): 263-5.
27. Nasri H, Shirzad H. Toxicity and safety of medicinal plants. J HerbMed Plarmacol 2013; 2(2): 21-2.
28. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Protective effects of herbal antioxidants on diabetic kidney disease. J Res Med Sci 2014; 19(1): 82-3.
29. Halwachs-Baumann G, Katzensteiner S, Schnedl W, Purstner P, Pieber T, Wilders-Truschnig M. Comparative evaluation of three assay systems for automated determination of hemoglobin A1c. Clin Chem 1997; 43(3): 511-7.
30. Turpeinen U, Karjalainen U, Stenman UH. Three assays for glycohemoglobin compared. Clin Chem 1995; 41(2): 191-5.
31. Hawkins RC. Comparison of four point-of-care

HbA1c analytical systems against central laboratory analysis. Singapore Med J 2003; 44(1): 8-11.
32. Goldberg RB, Mather K. Targeting the consequences of the metabolic syndrome in the Diabetes Prevention Program. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012; 32(9): 2077-90.
33. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. Int J Prev Med 2014; 5(8): 927-46.
34. Nasri H, Ardalan MR, Rafieian-Kopaei M. On the occasion of world hypertension day 2014: A nephrology point of view. J Res Med Sci 2014; 19(9): 911-2.
35. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Metformin: Current knowledge. J Res Med Sci 2014; 19(7): 658-64.
36. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardization of HbA1c/glycohemoglobin determinations. J Int Fed Clin Chem 1996; 8(2): 62-7.
37. Nasri H, Kheiri S. Effects of diabetes mellitus, age, and duration of dialysis on parathormone in chronic hemodialysis patients. Saudi J Kidney Dis Transpl 2008; 19(4): 608-13.
38. Nasri H, Baradaran HR. Lipids in association with serum magnesium in diabetes mellitus patients. Bratisl Lek Listy 2008; 109(7): 302-6.
39. Baradaran A, Behradmanesh S, Nasri H. Association of body mass index and serum vitamin D level in healthy Iranian adolescents. Endokrynol Pol 2012; 63(1): 29-33.
40. Nasri H. World kidney day 2013: acute kidney injury; a public health aware. Iran J Public Health 2013; 42(3): 338-40.

Journal of Isfahan Medical School Received: 12.01.2015

Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015 Accepted: 19.03.2015

Comparing Three Methods of HbA1c Measurement with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Azar Baradaran MD[1], Azadeh Karami MD[2]

Short Communication

Abstract

Background: The global prevalence of diabetes mellitus is increasing rapidly. Measurement of glycated hemoglobin, predominantly HbA1c, is fundamental to the management of patients with diabetes. HbA1c is used to monitor long-term glycemic control, adjust therapy, assess the quality of diabetes care and predict the risk for the development of complications. While HbA1c is the standard indicator for long-term glycemic control in diabetes, there are different methods for measurement of HbA1c and all laboratories do not use the reference method of high-performance liquid chromatography (HPLC). This study aimed to compare three different methods of measuring HbA1c with HPLC to find out which method have acceptable concordance and correlation with the reference method.

Methods: 58 patients with diabetes mellitus were assessed. Blood sample of each patient was checked via Diazyme (enzymatic assay), Nycocard (boronate-affinity binding) and Biosystem (microcalumn chromatography). The values of HbA1c in each method were compared with the Knauer-HPLC results.

Findings: The mean (SD) of differential values between each method and HPLC in ANOVA test was 1.8 (1.1) for Nycocard-HPLC, 1.5 (1.1) for Biosystem-HPLC, and 1.3 (1.2) for Diazyme-HPLC. Pearson's correlation coefficient was 0.76 between Nycocard and HPLC, 0.75 between Diazyme and HPLC and 0.68 between Biosystem and HPLC. With HPLC linear regression parameters were also determined for each method.

Conclusion: Diazyme had a better performance and showed a greater concordance with HPLC among others; although it was not an ideal alternative for HPLC.

Keywords: High-performance liquid chromatography (HPLC), HbA1c, Diabetes mellitus, Enzymatic assay, Column chromatograghy

Citation: Baradaran A, Karami A. **Comparing Three Methods of HbA1c Measurement with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 258-66

1- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Resident, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Azar Baradaran MD, Email: azarbaradaran@yahoo.com

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

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

14. **Proof Reading:** A computer prints out is sent to the corresponding author for proof reading before publication in order to avoid any mistakes. Corrections should be marked clearly and sent immediately to the Journal office.
15. **Abbreviations and symbols**: Use only standard abbreviations. **Avoid using them in the title and abstract**. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
16. The **corresponding author:** Will be supplied with 1 free issue.
17. **Ethical guidelines**: Ethical considerations must be addressed in the Materials and Methods. Please state that **informed consent** was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project.Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your Institute or agency.
18. **Conflicts of interest:** Authors must acknowledge and declare any sources of funding and potential conflicting interest, such as receiving funds or fees by, or holding stocks and shares in, an organization that may profit or lose through publication of your paper. Declaring a competing interest will not lead to automatic rejection of the paper, but we would like to be made aware of it.
19. **Page charges:** There are no charges for publication in this Journal.
20. **Copyright:** The entire contents of the Journal of Isfahan Medical School are protected under international copyrights. This Journal is for your personal noncommercial use. You may not modify copy, distribute, transmit, display, or publish any materials contained on the Journal without the prior written permission of it or the appropriate copyright owner.
21. **Peer review process:** All manuscripts are considered to be confidential. They are peer-reviewed by at least 3 anonymous reviewers selected by the Editorial Board. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor decision to accept, reject, or require modifications. If the manuscript is completely acceptable according to the criteria set forth in these instructions, it is scheduled for the next available issue.
22. Journal has entire right for accept or reject any of received manuscripts.
23. The editors, editorial board, sponsoring organization, and publisher do not accept responsibility for the statements expressed by authors in their contributions.
24. **Communicating with the Editorial Office:** We encourage you to communicate with the JIMS Editorial Office and to check on the status of a manuscript via journal site: (http://journals.mui.ac.ir/jims) only. For more in formations you can contact with JIMS office via E-mail address (jims@med.mui.ac.ir).

INSTRUCTION TO AUTHORS

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

Editorial Board (In alphabetical order)

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

JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015

Isfahan University of Medical Sciences

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

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

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

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

Office:
P.O. Box 81744-176, Isfahan, I.R. IRAN
Telefax: +98 31 37922291
E-mail: jims@med.mui.ac.ir
Website: http://www.journals.mui.ac.ir/jims
Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy edit, Layout edit, Design and Print:
Farzanegan Radandish Co.
P.O. Box 81465-1798, Isfahan, I.R. IRAN
Telefax: +98 31 36686302
E-mail: esfahanfarzanegan@yahoo.com
f.radandish@gmail.com
www.farzaneganco.ir
Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexers

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

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

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