



مقاله های پژوهشی

- تعیین محدوده‌ی طبیعی و پروفایل ارگانیک اسیدهای ادرار در رده‌های سنی مختلف کودکان سالم ایران.....۴۱۷
 اعظم دادخواه، دکتر مهین هاشمی پور، دکتر افشین فسیحی، دکتر بهارا براتی، دکتر مرتضی پورفرزام
- تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی ژن NS دو جدایه‌ی آنفلوآنزای H2N9 و بررسی خصوصیات رشد این ویروس‌ها بر روی سلول‌های A549.....۴۳۲
 دکتر شهلا شاهسوندی، عباس احمدی و سمه‌جانی، محمد شایسته پور، کاوه صادقی، دکتر محمد مجید ابراهیمی، هادی فاضل
- بررسی پلی مورفسم ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ارتباط آن با رتیئوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در اهواز.....۴۴۲
 دکتر جواد محمدی اصل، ارغوان سلیمانی زاده، دکتر حاجیه بی بی شهبازیان، دکتر حشمت اله شهبازیان، ندا گلچین
- اثر داروی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌ی کموکاینی CXCR3 مربوط به لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱.....۴۵۳
 محدثه طغیانی خوراسگانی، دکتر ناهید اسکندری، دکتر مرجان قراگوزلو، دکتر محمد فضیلتی

مقاله کوتاه

- بررسی ۵ ساله‌ی شاخص‌های برنامه‌ی ریشه‌کنی فلج شل حاد در استان اصفهان و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های استاندارد جهانی.....۴۶۱
 اسماعیل اختر، دکتر رضا فدایی نوبری

Original Articles

- Establishment of Reference Ranges and Profile of Urinary Organic Acids in Different Pediatric Age Groups of the Iranian Healthy Population.....431
 Azam Dadkhah, Mahin Hashemipour MD, Afshin Fassihi PhD, Bahara Barati PharmD, Morteza Pourfarzam PhD
- Sequencing and Phylogenetic Analysis of NS Gene of Two Isolates of H9N2 Influenza Virus and the Growth Characteristics of the Virus on A549 Cells.....441
 Shahla Shahsavandi PhD, Abbas Ahmadi-Vasmehjani, Mohammad Shayestehpour MSc, Kaweh Sadeghi MSc, Mohammad Majid Ebrahimi PhD, Hadi Fazel MSc
- Genetic Polymorphisms of Superoxide Dismutase 1 and Its Relationship to Diabetic Neuropathy and Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Ahvaz, Iran.....452
 Javad Mohammadi-Asl PhD, Arghavan Soleimanizadeh MSc, Hajieh Bibi Shahbazian PhD, Heshmatollah Shahbazian PhD, Neda Golchin MSc
- The Effect of Silymarin on the Expression of Chemokine Receptors in T Helper 1 (Th1) Cells 460
 Mohaddese Toghiani-Khorasgani, Nahid Eskandari MD, PhD, Marjan Gharagozloo PhD, Mohammad Fazilati PhD

Short Communication

- Evaluation of the Surveillance System for Acute Flaccid Paralysis (AFP) in Iran during the Years 2003-2007 and Its Comparison with Worldwide Standards.....469
 Esmaeil Akhtar MSc, Reza Fadaei-Nobari MD



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۸۰)، بهمنه اول خرداد ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

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

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

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

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

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

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

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

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

راهنمای نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

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

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

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

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

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

اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

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

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

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

اگر منبع مورد نظر کتاب است:

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

(EN): Romenes GJ. Cunningham's manual. 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 مسؤوّل ارسال می‌گردد که لازم است در کوتاه‌ترین زمان تغییرات مورد نظر مجله انجام داده، از طریق وبسایت مجله ارسال نماید.

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

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

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

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

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

تعیین محدوده‌ی طبیعی و پروفایل ارگانیک اسیدهای ادرار در رده‌های سنی مختلف کودکان سالم ایران.....۴۱۷
اعظم دادخواه، دکتر مهین هاشمی‌پور، دکتر افشین فصیحی، دکتر بهارا براتی، دکتر مرتضی پورفرزام

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی ژن NS دو جدایه‌ی آنفلوانزای H۹N۲ و بررسی خصوصیات رشد این ویروس‌ها بر روی سلول‌های A۵۴۹.....۴۳۲
دکتر شهلا شاهسوندی، عباس احمدی و سمه‌جانی، محمد شایسته‌پور، کاوه صادقی، دکتر محمد مجید ابراهیمی، هادی فاضل

بررسی پلی‌مورفیسم ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ارتباط آن با رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در اهواز.....۴۴۲
دکتر جواد محمدی اصل، ارغوان سلیمانی‌زاده، دکتر حاجیه بی‌بی شهبازیان، دکتر حشمت اله شهبازیان، ندا گلچین

اثر داروی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌ی کموکاینی CXCR۳ مربوط به لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱.....۴۵۳
محدثه طغیانی خوراسگانی، دکتر ناهید اسکندری، دکتر مرجان قراگوزلو، دکتر محمد فضیلتی

مقاله کوتاه

بررسی ۵ ساله‌ی شاخص‌های برنامه‌ی ریشه‌کنی فلج شل حاد در استان اصفهان و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های استاندارد جهانی.....۴۶۱
اسماعیل اختر، دکتر رضا فدایی نوبری

تعیین محدوده‌ی طبیعی و پروفایل ارگانیک اسیدهای ادرار در رده‌های سنی مختلف کودکان سالم ایران

اعظم دادخواه^۱، دکتر مهین هاشمی پور^۲، دکتر افشین فصیحی^۳، دکتر بهارا براتی^۴، دکتر مرتضی پورفرزام^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ارگانیک اسیدوری‌ها دسته‌ی مهمی از بیماری‌های ارثی متابولیک هستند که در صورت عدم تشخیص و درمان زود هنگام، بسیاری از این اختلالات منجر به آسیب مغزی دائمی و یا مرگ می‌شوند. به همین دلیل، تشخیص دقیق و سریع این بیماری‌ها به منظور شروع درمان مؤثر از اهمیت بالایی برخوردار است. تشخیص این دسته اختلالات، مستلزم آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار توسط گاز کروماتوگرافی-طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) یا (Gas chromatography/mass spectrometry) می‌باشد. از آن جا که عوامل ژنتیکی و محیطی و عادت‌های غذایی می‌تواند در غلظت و پروفایل ارگانیک اسیدها تغییر ایجاد کند، برای هر جمعیتی بایستی الگوی متناسب با همان جمعیت جمع‌آوری شود. چون چنین اطلاعاتی در مورد ایران وجود ندارد، پس لازم است تا فراهم گردد.

روش‌ها: ۱۴۰ نمونه‌ی ادرار راندم از افراد سالم در ۴ رده‌ی سنی نوزادان رسیده (> 30 روزه)، نوزادان نارس، کودکان با سن ۱ ماه تا ۲ سال و کودکان بالاتر از ۲سال جمع‌آوری شد. علاوه بر آن، تعداد ۱۰ نمونه از کودکان مشکوک به بیماری مادرزادی متابولیک جمع‌آوری گردید. پس از استخراج از ادرار و تهیه‌ی مشتق (Trimethylsilyl) TMS اسیدهای ارگانیک به روش GC/MS مورد آنالیز کمی و کیفی قرار گرفتند.

یافته‌ها: تعداد ۶۱ ترکیب ارگانیک اسید در ۱۴۰ نمونه‌ی ادرار طبیعی مطالعه شده، قابل اندازه‌گیری بود. این ترکیبات شامل اجزای طبیعی ادرار و همچنین نشانگرهای بیماری‌ها می‌باشند. غلظت این ترکیبات به صورت محدوده‌ی طبیعی ۲/۵-۹۷/۵ درصد گزارش شد. همچنین از میان ۱۰ نمونه‌ی مشکوک به بیماری متابولیک، ۲ بیمار مبتلا به متیل مالونیک اسیدی، ۱ بیمار مبتلا به گلووتاریک اسیدی نوع ۲ و ۱ بیمار پروپیونیک اسیدمی شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: آزمایش آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار تا به امروز در ایران انجام نگرفته است و نمونه‌ها برای آنالیز به خارج از کشور فرستاده می‌شدند. همچنین اطلاعات مربوط به غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک ادرار برای جمعیت سالم کشور موجود نبود و این مقاله برای اولین بار این نتایج را گزارش نمود. با برپایی این روش در کشور و آنالیز ادرار بیماران مشکوک به اختلالات متابولیک، می‌توان با تشخیص سریع این بیماری‌ها و درمان به موقع از عوارض جبران ناپذیر آن‌ها جلوگیری کرد. این مطالعه همچنین نشانگر این بود که در درصد بالایی از بیمارانی که از لحاظ بالینی دارای علائم بیماری ارثی متابولیک هستند، این بیماری‌ها در حقیقت وجود دارد و به نظر می‌رسد این بیماری‌ها دارای شیوع بالایی هستند. همچنین به نظر می‌رسد که در ایران متیل مالونیک اسیدی، شایع‌ترین بیماری در بین بیماران دارای علائم کلاسیک ارگانیک اسیدی باشد.

واژگان کلیدی: ارگانیک اسیدهای ادرار، بیماری‌های مادرزادی متابولیسیم، گاز کروماتوگرافی و طیف‌سنجی جرمی، محدوده‌ی طبیعی

ارجاع: دادخواه اعظم، هاشمی پور مهین، فصیحی افشین، براتی بهارا، پورفرزام مرتضی. **تعیین محدوده‌ی طبیعی و پروفایل ارگانیک اسیدهای**

ادرار در رده‌های سنی مختلف کودکان سالم ایران. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۳۱-۴۱۷

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۸۹۴۹۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۳- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- داروساز، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: pourfarzam@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤو: دکتر مرتضی پورفرزام

مقدمه

ارگانیک اسیدوری یا ارگانیک اسیدمی گروه نامتجانسی از بیماری های ارثی متابولیک هستند که با تجمع اسیدهای ارگانیک در مایعات بدن و افزایش دفع ادراری آن‌ها تشخیص داده می‌شوند (۱). اختلالات مربوط به متابولیسم ارگانیک اسیدها در نتیجه‌ی مسدود شدن مسیر کاتابولیسم آمینو اسیدها، آمین‌های بیوژنیک و اسیدهای چرب به وجود می‌آیند که این مسدود شدن به علت وجود یک نقص ژنتیکی در ساختار آنزیم یا عامل مشترک خاص و در نتیجه، اختلال در عملکرد آنزیم ایجاد می‌شود. مواردی هم گزارش شده است که در اثر نقص اکتسابی در عملکرد آنزیم به وجود می‌آیند مانند کمبود غذایی ویتامین B₁₂ در اثر نقص در عملکرد آنزیمی، سویستراهای آن آنزیم در بدن تجمع می‌یابند و در ادرار دفع می‌شوند (۲).

به نظر می‌رسد که اختلالات مربوط به ارگانیک اسیدها، رایج‌ترین اختلالات متابولیکی ارثی در کودکانی می‌باشند که به شدت بیمار هستند و همراه با آمینو اسیدوپاتی‌ها، شایع‌ترین گروه از اختلالات متابولیکی مادرزادی را در بسیاری جمعیت‌ها شامل می‌شوند (۳).

لازمه‌ی تشخیص این دسته بیماری‌ها، شناسایی الگوی غیر طبیعی ارگانیک اسیدها در مایعات بیولوژیک بدن و به خصوص ادرار می‌باشد. از آن جا که ارگانیک اسیدها محصول واسطه‌ی متابولیسم ترکیبات دیگری نیز می‌باشند، تغییرات پاتولوژیک در پروفایل اسیدهای آلی ادرار، در بیش از ۶۵ اختلال متابولیک ارثی قابل مشاهده است که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به سندرم ری و شبه ری، بیماری استفراغ

جامائیکا و کمبود ویتامین B₁₂ اشاره کرد (۴-۸). عواقب بالینی این بیماری‌ها اغلب شدید است که در بسیاری از موارد به علت تجمع مواد سمی، کاهش تولید انرژی، تداخل با عملکرد طبیعی یا اثرات ناشی از کاهش سنتز ترکیبات ضروری از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر، به خصوص در اطفال، به شمار می‌آیند. این بیماری‌ها بر خلاف آن چه تصور می‌شود، بیماری‌های نادری نیستند، فراوانی آن‌ها در مجموع، بالاتر از ۱:۱۰۰۰ و در بعضی گزارش‌ها ۱:۵۰۰ است (۹-۱۱).

اعتقاد بر این است که شیوع این بیماری‌ها از مقدار تخمین زده شده بیشتر است و مشکلات در تشخیص بالینی توسط پزشک، که به طور معمول پس از رد بیماری‌های شایع‌تر احتمال بیماری‌های متابولیک داده می‌شود، مشکلات مربوط به تشخیص آزمایشگاهی که نیازمند تکنیک‌های پیچیده است و جمع‌آوری به موقع نمونه در زمانی که بیماری حاد است، از دلایل آن است (۱۲). ناهمگونی و تعدد علائم و نشانه‌های بیماران مبتلا، چالش‌های تشخیصی مهمی نزد پزشکان متخصص ایجاد کرده است و از آن جایی که اکثر بیماری‌های متابولیک ارثی درمان پذیرند، لازم است با انجام آزمایش‌های تشخیصی و شناسایی هر چه سریع‌تر این بیماری‌ها، کار درمان بیمار آغاز گردد، تا بتوان بدین وسیله مانع آسیب دایمی به سیستم عصبی و عقب ماندگی ذهنی و یا مرگ این بیماران شد (۳-۴).

گاز کروماتوگرافی و طیف‌سنجی جرمی، روشی استاندارد برای آنالیز ارگانیک اسیدها می‌باشد که در بسیاری کشورها راه اندازی شده است. برپایی روشی معتبر، سریع و حساس برای آنالیز ترکیباتی با وزن

مولکولی پایین همچون ارگانیک اسیدها، می‌تواند اختلالات متابولیکی ارثی جدید را نیز کشف کند (۱۳). آزمایش آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار در ایران انجام نشده بود و نمونه‌ها برای آنالیز به خارج از کشور فرستاده می‌شدند، که در بسیاری از موارد، به خاطر تأخیر در تشخیص، باعث آسیب‌های جدی و برگشت ناپذیری به بیماران شده است (۳). همچنین اطلاعات مربوط به غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک ادرار برای جمعیت سالم کشور موجود نیست. این مقاله برای اولین بار این نتایج را گزارش می‌کند. با برپایی این روش در کشور و آنالیز ادرار بیماران مشکوک به اختلالات متابولیک، می‌توان با تشخیص سریع این بیماری‌ها و درمان به موقع از عوارض جبران ناپذیری که باعث عقب ماندگی‌های ذهنی و جسمی و حتی مرگ کودکان می‌شود جلوگیری کرد.

روش‌ها

نمونه‌گیری: ۱۴۰ نمونه‌ی ادرار (۳۵ نمونه در هر رده‌ی سنی) در چهار گروه سنی نوزادان نارس (سن حاملگی ۲۸-۳۶) با سن بین ۱-۳۰ روز، گروه نوزادان رسیده (سن حاملگی ۳۷-۴۲ هفته) با سن بین ۱-۳۰ روز، کودکان با سن ۱ ماه تا ۲ سال سن، کودکان ۶-۲ ساله از افراد سالم و تعداد ۱۰ نمونه از بیماران مشکوک به اختلالات مادرزادی متابولیک، با علائم کلاسیک بیماری، جمع‌آوری شدند. در هر گروه سنی افراد به گونه‌ای انتخاب شدند که نیمی دختر و نیمی پسر بودند، تحت درمان با هیچ دارویی نبودند و همچنین سابقه‌ی بیماری متابولیک یا مرگ ناگهانی کودکان در خانواده نداشتند.

نمونه‌گیری از نوزادان در بخش نوزادان بیمارستان شهید بهشتی اصفهان و تحت نظر متخصص نوزادان و با استفاده از کیسه‌ی جمع‌آوری ادرار انجام گرفت. نمونه‌گیری از سایر گروه‌های سنی در مهدهای کودک در سطح شهر اصفهان انجام گرفت. نمونه‌گیری از بیماران مشکوک به بیماری‌های متابولیک تحت نظر متخصص غدد و متابولیسم در بیمارستان امام حسین (ع) شهر اصفهان صورت گرفت.

از افراد حدود ۱۰ میلی‌لیتر ادرار به صورت تصادفی جمع‌آوری شد و به لوله‌ی فالتون منتقل گردید و ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه، برای اندازه‌گیری کراتینین، به کرایو ویال انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و تا زمان انجام آنالیز در آن جا نگهداری شد. کلیه‌ی اندازه‌گیری‌ها قبل از مدت ۶ ماه از زمان نمونه‌گیری انجام شد.

سن، جنسیت و در مورد نوزادان نوع تغذیه (شیر مادر یا شیر خشک) ثبت شد. در گروه نوزادان نارس، نوزادانی که نارس‌ی آن‌ها به دلیل بیماری‌های مشخص مادری مثل فشار خون مادر، دیابت پیشرفته‌ی حاملگی، بیماری قلبی - کلیوی بود و یا نوزاد مبتلا به آنومالی‌های شدید مادرزادی بود، وارد مطالعه نشدند. در گروه نوزادان رسیده، نوزادان سالم بدون هیچ سابقه‌ی بیماری‌ی مادر در هنگام بارداری، بدون آنومالی‌های مادرزادی و دارای وزن مناسب (بالاتر از ۲۵۰۰ گرم) مورد مطالعه قرار گرفتند.

اندازه‌گیری کراتینین ادرار: برای اندازه‌گیری کمی، غلظت ادراری ارگانیک اسیدها یا بایستی در ادرار ۲۴ ساعته اندازه‌گیری شود و یا نسبت به غلظت ادراری کراتینین نرمالیز شوند. به دلیل مشکلات

پس از آن، نمونه با اضافه کردن ۱ گرم کلرید سدیم اشباع شد. سپس سه برابر حجم نمونه، حلال آلی اتیل استات (۶ میلی‌لیتر) به آن اضافه شد و نمونه به مدت یک دقیقه ورتکس شد.

پس از سانتریفیوژ کردن، فاز آلی به یک لوله‌ی آزمایش حاوی ۲ گرم SO_4Na_2 Anhydrous منتقل شد و عمل استخراج با حلال یک بار دیگر تکرار شد و فازهای آلی مخلوط شدند. پس از جداکردن فاز آلی از SO_4Na_2 ، حلال با استفاده از جریان گاز نیتروژن تبخیر شد تا به حجم ۱ میلی‌لیتر رسید. در این موقع، نمونه به کرایو ویال حاوی ۲۰ میکرولیتر پیریدین منتقل شد و عمل خشک شدن تا خشک شدن کامل حلال ادامه یافت. سپس ۲۰ میکرولیتر پیریدین و ۸۰ میکرولیتر TMCS (Trimethylchlorosilane) ۱۰ درصد + BSTFA [N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] اضافه شد و پس از ورتکس کردن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد تا مشتق‌سازی کامل شود.

پس از سرد شدن ۱ میکرولیتر از نمونه توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی و طیف‌سنج جرمی Hewlett packard مدل ۶۸۹۰ با استفاده از ستون (۲۵ m x ۰/۲۵ mm x ۰/۲۵ um) DB-۵ که متشکل از ۵ درصد دی‌فنیل و ۹۵ درصد دی‌متیل پلی‌سایلوکسان است، آنالیز شد.

آنالیز نمونه‌ها توسط دستگاه GC/MS (Gas chromatography/mass spectrometry): یک میکرولیتر از هر نمونه از طریق سرنگ تزریق در حالت Split و در دمای ۲۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد همراه با گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر

جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته، به طور معمول روش دوم به خاطر سهولت نمونه‌گیری مطالعات تشخیصی استفاده می‌شود (۵). بنابراین باید پیش از آنالیز ارگانیک اسیدها، کراتینین به طور دقیق تعیین شود که به این منظور، از روش پیکرات قلبایی بر اساس واکنش ژافه استفاده شد.

آنالیز ارگانیک اسیدها: روش استاندارد و مرجع برای آنالیز ارگانیک اسیدها، گاز کروماتوگرافی و طیف‌سنجی جرمی است (۶). ارگانیک اسیدها ابتدا با حلال از ادرار استخراج می‌شوند و با توجه به این که ترکیباتی غیر فرار هستند، قبل از آنالیز با گاز کروماتوگرافی، مشتق‌سازی و تبدیل به استرهای تری‌متیل‌سیلیل (TMS یا Trimethylsilyl) می‌شوند. این ترکیبات سپس توسط گاز کروماتوگرافی از یکدیگر جدا و با استفاده از طیف‌سنجی جرمی شناسایی می‌شوند.

آماده‌سازی نمونه‌های ادرار برای آنالیز: حجم ادراری معادل ۲ میکرومول کراتینین به یک ویال شیشه‌ای در پیچ‌دار ۱۲۵ x ۲۰ میلی‌متری، انتقال داده شد. حجم ادرار استفاده شده بین ۲۰۰۰-۵۰۰ میکرولیتر بود. بنابراین، در مواردی که به حجم ادرار بیشتر از ۲۰۰۰ میکرولیتر نیاز بود (کراتینین ادرار کمتر از ۱ میلی‌مولار)، حداکثر از ۲۰۰۰ میکرولیتر نمونه و در مواردی که کمتر از ۵۰۰ میکرولیتر نمونه نیاز بود (کراتینین ادرار بیشتر از ۴ میلی‌مولار) حداقل از ۵۰۰ میکرولیتر نمونه استفاده شد.

همه‌ی نمونه‌های ادرار با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به نمونه‌ی ادرار، ۵۰ میکرولیتر از استاندارد داخلی (هپتادکانوئیک اسید ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متانول) و ۱۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۴ مولار اضافه شد تا محلول اسیدی شود.

در دقیقه تزریق شد.

برنامه ی دمایی آون به این صورت بود که دمای آغازین ۶۵ درجه ی سانتی گراد بود که برای ۴ دقیقه در این درجه ی حرارت باقی می ماند. سپس با گرادیان حرارتی ۶ درجه در دقیقه به دمای ۲۵۵ درجه ی سانتی گراد رسید و بعد از آن با گرادیان حرارتی ۲۰ درجه در دقیقه، به دمای ۲۸۰ درجه ی سانتی گراد رسید. این برنامه ۳۲/۹۲ دقیقه به طول انجامید. طیف سنج جرمی در حالت اسکن برای تشخیص همهی یون های وارد شده به اسپکترومتر قرار گرفت و قطعات با m/z ۵۵۰-۵۰ را اسکن می کرد. برای جلوگیری از تأثیرات خروج حلال و محصولات فرعی TMS (Trimethylsilyl) زمان اسکن از ۷ تا ۳۲/۹۲ دقیقه در نظر گرفته شد و در ۷ دقیقه ی اول، طیف سنج جرمی هیچ یونی را اندازه گیری نکرد.

پس از آنالیز کلیه ی نمونه ها، نشانگرهای بیماری که در جدول ۱ آمده اند، تعیین مقدار شدند. شناسایی هر ترکیب به وسیله ی مقایسه ی زمان نگهداری (Retention time) و طیف جرمی ترکیب مورد نظر با ترکیبات استاندارد انجام گرفت. تعیین مقدار هر ترکیب با مقایسه ی مساحت پیک آن ترکیب با مساحت پیک استاندارد داخلی و با توجه به ضریب استخراج آن ترکیب از ادرار انجام شد. روش تجزیه و تحلیل داده ها: پس از جمع آوری، نتایج به صورت محدوده ی طبیعی (۹۷/۵-۲/۵ درصد) بیان شد.

یافته ها

تعداد ۶۱ ترکیب در ۱۴۰ نمونه ی ادرار از افراد سالم در رده های سنی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و

نتایج آنالیز نیمه کمی ترکیبات با تکنیک GC/MS، در جدول ۱ آمده است. کمترین مقدار قابل اندازه گیری Creatinine (Detection limit) با این روش برابر با 1 mmol/mol می باشد. این ترکیبات اغلب نشانگر بیماری های متابولیک می باشند که لیستی از آن ها در جدول ۱ آمده است.

تعدادی از ترکیبات مانند لاکتیک اسید، سوکسینیک اسید، اگزالیک اسید، فومارات، هیپوریک اسید در اکثر نمونه ها دیده شد. شکل ۱ پروفایل ارگانیک اسیدهای موجود در ادرار فرد سالم را نشان می دهد.

از ۱۰ بیمار مشکوک به بیماری متابولیک که توسط این روش بررسی شدند، ۲ بیمار مبتلا به متیل مالونیک اسیدمیا و ۱ بیمار مبتلا به گلو تاریک اسیدوریا تایپ ۲ و ۱ بیمار مبتلا به پروپیونیک اسیدمیا شناسایی شدند. در بقیه ی افراد، هیچ گونه بیماری ارگانیک اسیدوریا شناسایی نشد.

بیمار ۱ (الف.الف)

پسر بچه ی ۱۶ ماهه ای که حاصل زایمان سزارین است و وزن او در هنگام تولد ۲۶۰۰ گرم بود، بیمار فرزند دوم خانواده بود و از پدر و مادری با نسبت فامیلی نزدیک متولد گردیده بود. در خانواده، سابقه ی بیماری مشابه یا مرگ ناگهانی نوزاد وجود نداشت. بیمار تا سن ۶ ماهگی در ظاهر سالم به نظر می رسید، اما بعد از آن دچار بی حالی و استفراغ های مکرر شد و پس از آن مبتلا به تاکی پنه و دیسترس تنفسی گردید تا این که به دنبال این تظاهرات بالینی، دچار کاهش سطح هوشیاری و حرکاتی شبیه تشنج گردید که در نهایت به کما منجر شد. پس از اقدامات درمانی و انجام دیالیز از حالت کما خارج شد و هوشیاری خود را به دست آورد. وجود ضایعات برفکی در

دهان، بی‌اشتهایی و دهیدراتاسیون از دیگر تظاهرات بالینی بیمار بود. کودک سابقه‌ی چندین بار بستری شدن در بیمارستان به علت حمله‌های متابولیکی، تاکی پنه و بی‌حالی را داشت. به دنبال پیشرفت بیماری و مشکلات مربوط به غذا نخوردن، بیمار دچار کاهش وزن و نارسایی رشد شد. تظاهرات هیپوتونی به صورت عدم توانایی کودک برای گردن

گرفتن، نشستن و راه رفتن بروز کرد. با توجه به نتایج آزمایش‌های بالینی اولیه (هیپوگلیسمی و نوتروپنی) و تظاهرات بالینی، ارگانیک اسیدی نیز جزء تشخیص احتمالی قرار گرفت. به دنبال این تشخیص احتمالی، نمونه‌ی ادرار کودک جهت آنالیز ارگانیک اسیدها جمع‌آوری و توسط GC/MS مورد بررسی قرار گرفت. پروفایل

جدول ۱. محدوده‌ی طبیعی ارگانیک اسیدها در ادرار افراد سالم (mmol/mol Creatinine)

نوزادان نارس (< ۳۰ روز)	نوزادان ترم (< ۳۰ روز)	کودکان ۱-۲۴ ماه	کودکان ۲-۶ سال	سن گروه	ردیف
				ارگانیک اسید	
*Nd	Nd-۱۶	Nd-۱۶	Nd-۱۶	N-Acetylaspartic acid	۱
Nd-۶	Nd-۱۲	Nd-۱۶	Nd-۶	N-Acetyltyrosin	۲
Nd	Nd	Nd	Nd	Butyrylglycine	۳
۸-۴۵	۶-۱۰۰	۹-۸۹	۲۰-۷۹	Cis-Aconitic acid	۴
۰/۵-۴۲/۵	۴-۴۰	Nd-۱۸/۵	Nd-۷	Adipic acid	۵
Nd-۴	Nd-۹	Nd-۹	Nd-۹	Azelaic acid	۶
۳۷-۳۶۳	۱۳-۹۸۳	۱۶-۴۶۸	Nd-۵۳۷	Citric acid	۷
۳-۴۵	۳-۱۲/۵	۱/۲-۱۷/۵	۲-۱۸	۲-Deoxytetronic acid	۸
۲-۱۸/۵	۰/۶-۱۴	۱-۱۶/۸	۱/۹-۱۶	Ethylmalonic acid	۹
۰/۱-۱۵/۶	۳-۴۹	۵-۳۲	۲-۲۷	Fumaric acid	۱۰
۴-۱۱	۰/۱-۳/۴	۳-۱۶/۳	۱-۱۴	۲,۵-Furandicarboxylic acid	۱۱
۱-۱۶/۲	۲/۳-۲۰	۱/۴-۱۱	۱-۹/۸	Glutaric acid	۱۲
۲-۴۰	۳-۴۰	۴-۸۲/۸	۲/۴-۶۱	Glyceric acid	۱۳
۳-۵۹	۱-۶۲	۳/۵-۱۰۳	۱۰-۱۴۶	Glycolic acid	۱۴
Nd-۱۳	Nd-۱۳	Nd-۱۰	Nd-۱۰	Glyoxylic acid	۱۵
Nd	Nd	Nd	Nd	Hexanoylglycin	۱۶
۴-۸۴	۱/۵-۲۷۴	۱۴-۴۴۶	۷۶-۶۳۰	Hippuric acid	۱۷
Nd-۱۲	Nd-۱۲	Nd-۱۲	Nd-۱۲	Homogentisic acid	۱۸
Nd-۲۴	۴-۲۳/۵	۴-۲۳/۵	Nd-۱۹	Homovanilic acid	۱۹
۳/۵-۶۲/۵	۴-۵۱	۰/۵-۴۰	۴-۲۲	(HMG) ۳-Hydroxy-۳-methylglutaryl	۲۰
Nd	Nd-۲۲	Nd-۱۶	Nd-۸/۵	۳-Hydroxysebacic acid	۲۱
Nd-۲	Nd-۵	Nd-۸/۶	Nd-۸/۲	۳-Hydroxybutyric acid	۲۲
Nd-۱۵	Nd-۱۶	Nd-۱۶	Nd-۱۶	۲-Hydroxyglutaric acid	۲۳
Nd-۱۸/۶	۵-۲۵	۱-۳۴	۱/۵-۲۲	۳-Hydroxypropionic acid	۲۴

* Nd Non detectable کمتر از حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری با روش استفاده شده

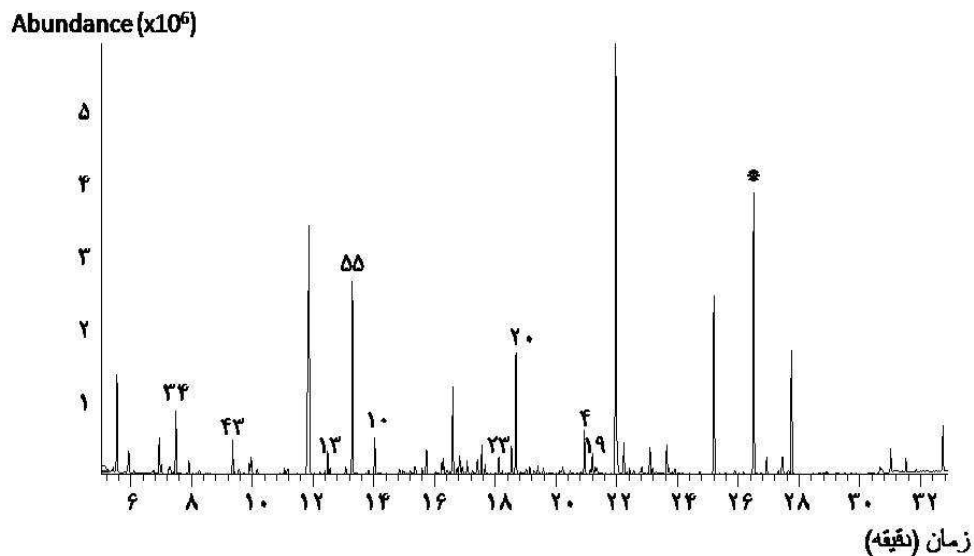
جدول ۱. محدوده‌ی طبیعی ارگانیک اسیدها (mmol/mol Creatinine) در ادرار افراد سالم (ادامه)

ردیف	سن گروه ارگانیک اسید	کودکان ۲-۶ سال	کودکان ۱-۲۴ ماه	نوزادان ترم (۳۰ روز <)	نوزادان نارس (۳۰ روز <)
۲۵	۳-Hydroxyisovaleric acid	۴/۴-۲۲	۵-۴۲	۵/۶-۴۳	۰/۱-۳۸
۲۶	۴-Hydroxyphenylacetic acid	۷-۷۵	۳/۵-۹۴	۲-۷۲	۴-۱۵۳
۲۷	۴-Hydroxyphenyllactic acid	Nd-۱۲	Nd-۱۲/۵	Nd-۵۲	Nd-۵۸
۲۸	۴-Hydroxybenzoic acid	Nd-۱۴	Nd-۱۱	Nd-۱۳/۵	Nd-۱۳
۲۹	۴-Hydroxyhippuric acid	۱۰-۱۳۱	۷-۱۴۹	۳-۸۰	۵-۴۳
۳۰	Isobutyrylglycine	Nd-۱/۵	Nd	Nd	Nd
۳۱	Isocitric acid	Nd-۸۶	Nd-۷۳	Nd-۳۵۶/۵	Nd-۲۴۲
۳۲	Isovalerylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۳۳	۲-Ketoglutaric acid	۴۵-۱۱۳	۷۳-۵۴۹	۲۱/۲-۵۶۰	۲۳-۵۵۰
۳۴	Lactic acid	۱۸-۳۹	۲۱-۳۵	۴۶-۳۱۴	۶۲-۳۰۵
۳۵	Malic acid	۰/۹-۵۶	۸-۷۱	Nd-۵۰/۵	Nd-۵۷
۳۶	Malonic acid	Nd-۴۷	Nd-۹/۵	Nd-۶	Nd-۲۰/۵
۳۷	Methylcitrate	Nd	Nd	Nd	Nd
۳۸	Methylmalonic acid	Nd-۵	Nd-۵/۴	Nd-۵/۷	Nd-۵
۳۹	Methylsuccinic acid	Nd-۱۶	Nd-۱۱	Nd-۱۲	Nd-۱۶/۹
۴۰	۳-Methylglutaric acid	Nd-۱/۵	Nd-۱	Nd-۱۱	Nd-۱۳
۴۱	Octanoylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۴۲	Orotic acid	۱-۳/۵	۱-۳/۱	۱/۵-۵/۲	۲-۶
۴۳	Oxalic acid	۸-۳۱۰	۴-۵۶۷	۴۷-۹۷۰	۱۲-۹۴۹
۴۴	Phosphate	۱۶-۲۷۷	۳/۵-۴۰۵	۶/۵-۱۲۸	۵/۳-۱۰۳
۴۵	p-cresol	Nd-۱۱۲	Nd-۹	Nd-۱۵	Nd-۱۷
۴۶	Phenol	۱/۵-۳۵	۳-۱۳/۵	۵-۲۸	۶-۲۳
۴۷	۱-Propentricarboxylic acid	۲-۶۰	۶-۲۸	۰/۵-۱۱/۳	۰/۱-۹
۴۸	Propionylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۴۹	Pyroglutamic acid	Nd-۶۲	Nd-۶۰	Nd-۶۷	Nd-۵۹
۵۰	Quinolinic acid	۲-۱۱	۲-۱۶	۲-۳۰	۱۰-۱۰۰/۲
۵۱	Pyruvic acid	۷-۲۰	۴-۸۷/۵	۱۹-۱۲۴	۲۱/۳-۱۵۰
۵۲	Sebacic acid	Nd-۷	Nd-۱۶	Nd-۱۳	Nd-۱۴
۵۳	Suberic acid	Nd-۱۰	Nd-۸/۹	۴-۲۳	۱-۲۷
۵۴	Suberylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۵۵	Succinic acid	۱۲-۱۲۸	۲۰-۲۰۲	۲۰-۴۸۳	۱۵-۶۱۸
۵۶	Sulphate	۷-۱۶	۲۶	۶/۵-۴۷	۲/۵-۱۱۴/۵
۵۷	Tiglic acid	Nd	Nd	Nd	Nd
۵۸	Tiglylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۵۹	Uracil	Nd-۲۶	Nd-۳۸	Nd-۴۱	Nd-۴۱
۶۰	Uric acid	Nd	Nd	Nd	Nd
۶۱	Vanillylmandelic acid	Nd-۱۴/۱	Nd-۱۶	Nd-۲۳/۲	Nd-۲۵

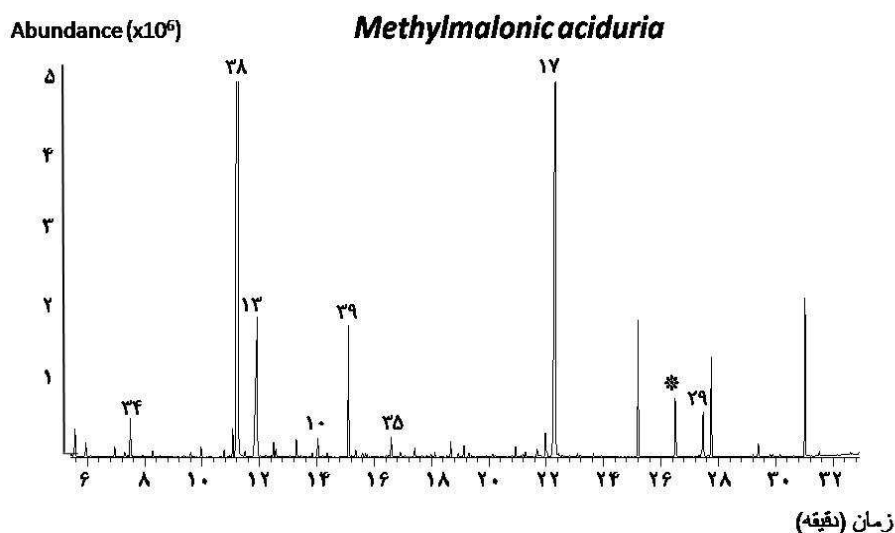
* Nd: Non detectable کمتر از حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری با روش استفاده شده

مرتبط است. این بیمار تحت درمان با شربت کارنی تین، ویتامین B₁₂ و قرص بیوتین بود و آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار پس از درمان، کاهش چشمگیری در دفع متیل مالونیک اسید نشان نداد که کمبود تغذیه‌ای ویتامین B₁₂ به عنوان عامل بیماری در این کودک را منتفی کرد.

بیمار در شکل ۲ نمایش داده شده است که نشان دهنده ی غلظت بالای متیل مالونیک اسید در ادرار است (بیمار: mmol/mol Creatinine ۴۳۲۲، دامنه‌ی طبیعی: (Non detectable: Nd) (Nd-۵/۴). این پروفایل با بیماری متیل مالونیک اسیدمیا یا نقص ویتامین B₁₂



شکل ۱. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار یک نوزاد سالم. شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند. * استاندارد داخلی (هیتادکانوئیک اسید)



شکل ۲. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار بیمار (الف.الف) مبتلا به متیل مالونیک اسیدمیا. شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند.

بیمار ۲: (الف.الف ب)

بیمار پسر ۸ ماهه، فرزند دوم خانواده و حاصل زایمان طبیعی بود که در بدو تولد به گفته‌ی مادر به علت گرانترینگ ۲ روز در بیمارستان بستری بود. این نوزاد با وزن ۲۶۵۰ گرم و پس از پایان یافتن سن کامل حاملگی (ترم) متولد گردیده بود. خواهر بزرگ‌تر این بیمار سابقه‌ی تشنج داشت و پدر و مادر منسوب بودند. بیمار از ۳ ماهگی گردن گرفت و تا ۶ ماهگی سالم به نظر می‌رسید، اما از ۶ ماهگی به دنبال واکسیناسیون دچار تب و تورم در ران چپ شد و به علت دیسترس تنفسی و بی‌حالی، در بیمارستان بستری گردید. در بررسی لام خون محیطی، لکوپنی و نوتروپنی نسبی و مطلق مشاهده شد؛ پلاکت‌ها کاهش داشتند و به صورت ژانت بودند. هیپراآمونمی دیگر یافته‌ی بالینی بیمار بود و سابقه‌ی بستری مکرر به علت تاکی‌پنه و دیسترس تنفسی وجود داشت. برای بیمار در ۸ ماهگی تشخیص احتمالی ارگانیک اسیدمی داده شد، اما متأسفانه پس از مدت کوتاهی به دلیل ایست قلبی در بیمارستان فوت کرد. آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار بیمار توسط GC/MS در مطالعه‌ی حاضر، دفع مقدار زیادی تیگلیل گلیسین (بیمار: mmol/mol Creatinine ۵۵/۷؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd)، ۳-هیدروکسی پروپیونیک اسید (بیمار mmol/mol Creatinine ۱۰۹/۱۵؛ دامنه‌ی طبیعی: ۱-۳۴)، متیل سترات (بیمار: mmol/mol Creatinine ۱۰۷/۶۵؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd) و پروپیونیل گلیسین (بیمار: mmol/mol Creatinine ۶/۷۷؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd) را نشان داد که مرتبط با بیماری پروپیونیک اسیدمی می‌باشد. پروفایل ارگانیک اسیدهای ادراری بیمار در شکل ۳ آمده است.

بیمار ۳: (ع.ص)

بیمار پسری ۳ ساله، حاصل زایمان طبیعی و ازدواج فامیلی و فرزند دوم خانواده بود. فرزند اول یک دختر ۵ ساله بود که به غیر از داشتن پاهای پرانتزی طبیعی به نظر می‌رسید. استفراغ‌های مکرر و بی‌حالی، از اولین یافته‌های بالینی بیمار در سن ۸ ماهگی بود. قبل از آن بیمار در ظاهر مشکلی نداشت و سالم به نظر می‌رسید. بیمار سابقه‌ی بستری شدن مکرر در بیمارستان به دلیل حمله‌های حاد متابولیک اسیدوز را داشت و به همین علت بی‌کربنات سدیم مصرف می‌کرد. به دلیل تنگی نفس و تنفس‌های تند، از قفسه‌ی سینه گرافی تهیه شد که نشان دهنده‌ی وجود یک تومور در نزدیکی ریه‌ی بیمار بود.

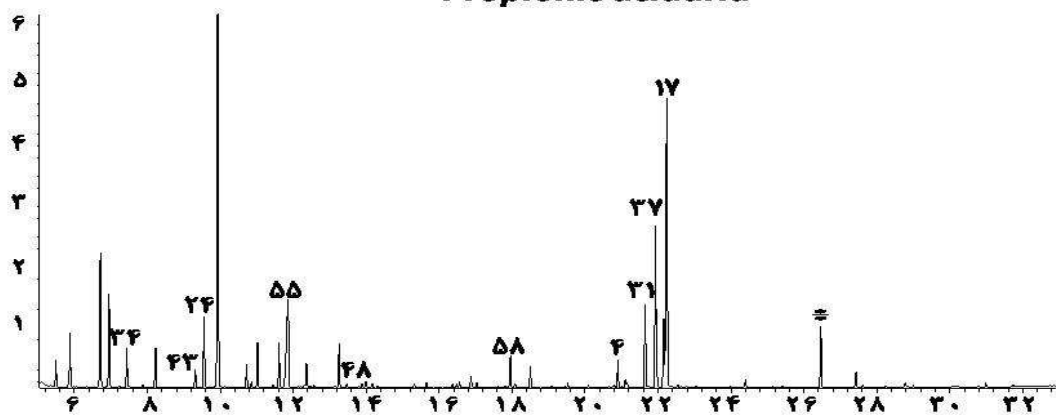
نمونه‌ی ادرار از بیمار در زمانی که با یکی از حملات متابولیکی در بیمارستان بستری شده بود، جمع‌آوری شد و پس از آنالیز با GC/MS، وجود مقادیر زیادی متیل مالونیک اسید را نشان داد (بیمار: mmol/mol Creatinine ۱۰۴۷؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd-۵/۴)، که نشانگر بیماری متیل مالونیک اسیدمی یا نقص در متابولیسم ویتامین B_{۱۲} می‌باشد.

بیمار ۴ (الف.م)

بیمار پسر ۷ ماهه‌ای، فرزند اول خانواده و حاصل زایمان طبیعی، با وزن ۲۸۰۰ گرم بود. پدر و مادر نسبت فامیلی داشتند؛ اما در خانواده سابقه‌ی هیچ‌گونه بیماری یا مرگ زودرس نوزاد وجود نداشت. استفراغ و بی‌حالی، از اولین علائمی بود که مدت کوتاهی پس از تولد در او پدیدار گشت. اسیدوز متابولیک و هیپوگلیسمی غیر کتوتیک از دیگر یافته‌های بالینی بیمار بود. در ۷ ماهگی به علت این که کودک به کما رفت، در بیمارستان بستری گردید.

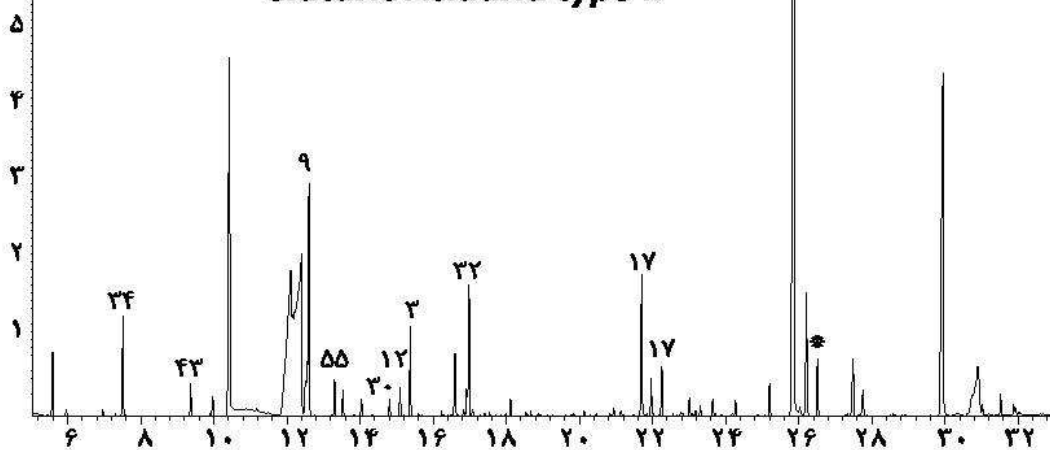
بوتیریل گلیسین (بیمار): $322/93 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛
 دامنه‌ی طبیعی: (Nd)، ایزووالریل گلیسین (بیمار):
 $270/5 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛ دامنه‌ی طبیعی: (Nd)
 بود که مربوط به بیماری گلوتاریک اسیدوریای تیپ
 II (یا کمبود آسیل کوا دهیدروژناز متعدد) بود.
 پروفایل ارگانیک اسیدهای ادراری این بیمار در
 شکل ۴ آمده است.

آنالیز پلاسما کاهش غلظت کارنیتین را نشان داد و
 ارگانیک اسیدی جزء تشخیص احتمالی قرار گرفت.
 نتایج آنالیز ادرار این بیمار در مطالعه‌ی حاضر،
 نشانگر دفع مقادیر قابل توجهی گلوتاریک اسید
 (بیمار: $45/26 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛ دامنه‌ی
 طبیعی: ۱۱-۱/۴)، ایزوبوتیریل گلیسین (بیمار):
 $50/5 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛ دامنه‌ی طبیعی: (Nd)،

Abundance ($\times 10^6$)**Propionic aciduria**

زمان (دقیقه)

شکل ۳. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار بیمار (الف.الف ب) مبتلا به پروپیونیک اسیدی. شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند.

Abundance ($\times 10^6$)**Glutaric Aciduria type II**

زمان (دقیقه)

شکل ۴. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار بیمار (م.آ) مبتلا به گلوتاریک اسیدوری نوع ۲. شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند.

بحث

بیماری های متابولیک ارثی، گروهی از اختلالات تک ژنی و مختلط هستند (حدود ۵۰۰ بیماری ژنتیکی) که تخصص ویژه‌ای از طب نوزادان و کودکان را تشکیل می دهد. اختلال در متابولیسم ارگانیک اسیدها از جمله‌ی این بیماری‌ها محسوب می شود.

عواقب بالینی این بیماری‌ها اغلب شدید است و در بسیاری از موارد از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر، به خصوص در اطفال، به شمار می آیند. تظاهرات بالینی در اکثر این بیماری‌ها متغیر و غیر اختصاصی است؛ بنابراین تشخیص صحیح آن‌ها بر اساس علائم بالینی به تنهایی دشوار است و نیاز به آزمایش‌های خاص بیوشیمیایی دارد (۱۴). یکی از آخرین تکنیک‌های مدرن بیوشیمیایی برای تشخیص بیماری‌های متابولیک ارثی، آنالیز نمونه‌های ادراری به روش گاز کروماتوگرافی / طیف‌سنجی جرمی است. این روش در سال ۱۹۹۶ توسط Tanaka و همکاران برای تشخیص بیماری‌های متابولیک ارثی استفاده شد (۱۵). از آن زمان تا به امروز، GC/MS به خاطر دقت، حساسیت و قدرت آنالیز کامل ترکیبات متعدد به طور همزمان، جهت تشخیص بیماری‌های متابولیک مادرزادی، در سراسر جهان به کار می رود. داده‌های GC/MS جامع و کمی است و همچنین برای تشخیص نوزادان با نتیجه‌ی غربالگری مثبت و نوزادان در معرض خطر با سابقه‌ی فامیلی این گونه بیماری‌ها و نیز ارزیابی از وضعیت بیماران، روش استاندارد به شمار می رود (۱۶).

با توجه به این که عوامل ژنتیکی و محیطی و همچنین عادات و نوع تغذیه می توانند غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک در ادرار را تغییر دهند

(۱۸-۱۷)؛ بنابراین ضروری است که هر جمعیتی داده‌های طبیعی متناسب با آن جمعیت را داشته باشد. مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است (۲۲-۱۸) که اغلب در نوع استاندارد داخلی استفاده شده، روش استخراج ارگانیک اسیدها از ادرار و یا روش مشتق‌سازی تفاوت دارند. روش‌های مختلفی برای استخراج ارگانیک اسیدها از ادرار وجود دارد مانند استخراج با حلال و استخراج با کروماتوگرافی ستونی. به دلیل سهولت و آسانی استخراج با حلال نسبت به روش‌های دیگر، از این روش در مطالعه‌ی حاضر استفاده شده است (۲۴-۲۳). Rinaldo و همکاران نیز، با استفاده از روش استخراج با حلال آلی، ارگانیک اسیدها را از ادرار استخراج و به وسیله‌ی GC/MS محدوده‌ی طبیعی را در ۴ گروه سنی مختلف تعیین کردند (۴).

Hoffmann و همکاران (۲۵) و نیز Sweetman (۲۶) با روش کروماتوگرافی مایع تقسیمی، ارگانیک اسیدها را استخراج و سپس به وسیله‌ی GC/MS محدوده‌ی طبیعی آن‌ها را در ادرار تعیین کردند.

مقادیر طبیعی به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر در مورد ۹۰ درصد از ترکیبات مشابه با مقادیر منتشر شده توسط Rinaldo و همکاران (۴) می باشد. کئژوگه‌های گلیسین (مانند هگزانوئیل گلیسین، اکتانوئیل گلیسین، ایزووالریل گلیسین، ترانس-سیناموئیل گلیسین، بوتیریل گلیسین، ایزوبوتیریل گلیسین، سوبریل گلیسین، ۳-فنیل پروپیونیل گلیسین) در مطالعه‌ی Rinaldo و همکاران (۴) در تعدادی از افراد سالم دفع می شود، اما در هیچ کدام از نمونه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر دیده نشد. به نظر می رسد این اختلاف ظاهری به خاطر تفاوت در روش باشد. در مطالعه‌ی

در بین نمونه‌های مربوط به گروه سنی نوزادان ترم، در ۲ مورد دفع ترکیب متیل مالونیک اسید بسیار بیشتر از مقدار ۹۷/۵ درصد به دست آمده بود. این نتیجه می‌تواند در ارتباط با نوزادانی باشد که مبتلا به متیل مالونیک اسیدمیا هستند، اما هنوز علایم بالینی بروز نکرده است. Hori و همکاران در یک برنامه‌ی غربالگری به وسیله‌ی GC/MS، ۱۲۲ مورد با سطح بالای دفع متیل مالونیک در ادرار نوزادان را گزارش کردند که تنها ۱۳ مورد از آن‌ها دارای علایم بالینی بودند و بقیه، هیچ علامت بالینی نداشتند (۳۰). افزایش دفع متیل مالونیک اسید در ادرار در نقص ترانس کوبالامین II و مالونیک اسیدوریا نیز دیده می‌شود. از طرفی، این نتیجه می‌تواند عللی غیر از اختلالات ارثی متابولیک داشته باشد، از جمله کمبود ویتامین B_{۱۲} (در شیرخواری که از مادر گیاهخوار یا مبتلا به کم‌خونی پرنیشیوز تغذیه می‌کند، کمبود اکتسابی ویتامین B_{۱۲} دیده شد)، نقص در جذب کمپلکس عامل داخلی - ویتامین B_{۱۲}، متابولیسم باکتری‌های روده‌ای، کاهش GFR (Glomerular filtration rate)، سوء تغذیه و سندرم Short bowel (۳۱). مطالعات بیشتری لازم است تا علت اصلی دفع بیش از حد متیل مالونیک اسید در این ۲ بیمار به ظاهر سالم مشخص شود.

آزمایش آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار تا به امروز در ایران انجام نگرفته است و نمونه‌ها برای آنالیز به خارج از کشور فرستاده می‌شوند که علاوه بر هزینه‌بر بودن برای بیمار، حداقل حدود یک ماه، طول می‌کشد که جواب به دست بیمار برسد. همچنین اطلاعات مربوط به غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک ادرار برای جمعیت سالم کشور موجود

Rinaldo و همکاران (۴) برای آنالیز کنژوگه‌های گلیسین از روش اضافه کردن ایزوتوپ پایدار استفاده شده است که روش دقیق‌تر و حساس‌تری است؛ اما نیاز به ایزوتوپ پایدار ترکیبات مورد نظر دارد.

در سال‌های اخیر برای آنالیز ارگانیک اسیدهای ادراری روش‌هایی به کار گرفته شده است که در آن مرحله‌ی استخراج با حلال حذف می‌شود و به جای آن، ابتدا اوره‌ی موجود در ادرار با آنزیم اورئاز تجزیه و سپس ادرار قبل از مشتق‌سازی با گاز نیتروژن خشک می‌شود. در صورت استفاده از ترکیبات لیبیل شده با ایزوتوپ پایدار به عنوان استاندارد، این روش حساس‌تر از روش‌های استخراج با حلال است و همچنین می‌تواند ترکیبات قطبی مانند آمینو اسیدها، قندها، پلی‌الکل‌ها، پورین و پیریمیدین‌ها را همزمان با ارگانیک اسیدها اندازه‌گیری کند (۲۷-۲۹).

مطالعه‌ای در ترکیه به منظور تعیین مقادیر طبیعی ارگانیک اسیدها متناسب با جمعیت این کشور انجام شد که داده‌های مطالعه‌ی حاضر در محدوده‌ی داده‌های به دست آمده از این مطالعه می‌باشد (۱۸). همچنین داده‌های به دست آمده در محدوده‌ی نتایج تحقیقات انجام شده در کشور ژاپن (۲۸) و جمعیت آمریکا (۲۹) می‌باشد.

در اکثر مطالعات انجام شده، متیل مالونیک اسیدمیا شایع‌ترین بیماری متابولیک است (۱۳). از بررسی ۱۰ بیمار مشکوک به متابولیک در این مطالعه، ۲ بیمار مبتلا به متیل مالونیک اسیدمیا شناسایی شدند. مطالعات بیشتری با تعداد نمونه‌ی بیشتر احتیاج است تا شیوع واقعی این بیماری در جمعیت کشور تعیین شود، اما احتمال می‌رود در ایران نیز متیل مالونیک اسیدمیا شایع‌ترین بیماری ارگانیک اسیدمی باشد.

بیماری در بین بیماران دارای علائم کلاسیک ارگانیک اسید می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین منابع مالی این پژوهش سپاس‌گزاری می‌گردد. همچنین از مدیریت درمان تأمین اجتماعی استان اصفهان، سازمان بهزیستی، مدیریت و کارکنان بیمارستان‌های الزهرا (س) و سیدالشهدا (ع) و شهید بهشتی اصفهان و همچنین والدین محترم کودکان این مورد مطالعه جهت اجازه‌ی نمونه‌گیری تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نیست و این مقاله برای اولین بار این نتایج را گزارش می‌کند. با برپایی این روش در کشور و آنالیز ادرار بیماران مشکوک به اختلالات متابولیک، می‌توان با تشخیص سریع این بیماری‌ها و درمان به موقع، از عوارض جبران‌ناپذیری که باعث عقب‌ماندگی‌های ذهنی و جسمی و حتی مرگ کودکان می‌شوند، جلوگیری کرد. این مطالعه همچنین نشانگر این است که در درصد بالایی از بیماران که از لحاظ بالینی دارای علائم بیماری ارثی متابولیک هستند، این بیماری‌ها در واقع وجود دارد و به نظر می‌رسد این بیماری‌ها دارای شیوع بالایی هستند. همچنین به نظر می‌رسد که در ایران متیل مالونیک اسیدمی، شایع‌ترین

References

- Chalmers RA, Lawson AM. Organic acids in man: analytical chemistry, biochemistry, and diagnosis of the organic acidurias: London, UK: Chapman and Hall; 1982.
- Seashore M. Metabolic disorders. In: Marcadante K, Kliegman RM, Behrman RE, Hal B. Jenson HB. Nelson essentials of pediatrics. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2010. p. 201.
- Pourfarzam M, Barati B. The necessity of screening of individuals with suspected inherited metabolic disorders for early diagnosis and treatment of related diseases. J Isfahan Med Sch 2013; 30(221): 2493-2505. [In Persian].
- Rinaldo P, Hahn S, Matern D. Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, Brun DE, editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostic. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005. p. 2207-47.
- Scriver CR, Sly WS, Childs B, Beaudet AL, Valle D, Kinzler KW, et al. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.
- Hommes FA. Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual: London, UK: John Wiley and Sons; 1990.
- Kumps A, Duez P, Mardens Y. Metabolic, nutritional, iatrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. Clin Chem 2002; 48(5): 708-17.
- Tuchman M, Ulstrom RA. Urinary organic acids in health and disease. Adv Pediatr 1985; 32: 469-506.
- Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. Arch Dis Child 2006; 91(11): 896-9.
- Brustolin S, Souza C, Puga AC, Refosco L, Pires R, Peres R, et al. Assessment of a pioneer metabolic information service in Brazil. Community Genet 2006; 9(2): 127-32.
- Mootha VK, Hirschhorn JN. Inborn variation in metabolism. Nat Genet 2010; 42(2): 97-8.
- Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. N Engl J Med 2003; 348(23): 2304-12.
- Wasant P, Liammongkolkul S, Kuptanon C, Vatanavicharn N, Sathienkijakanchai A, Shinka T. Organic acid disorders detected by urine organic acid analysis: twelve cases in Thailand over three-year experience. Clin Chim Acta 2008; 392(1-2): 63-8.
- Katajamaa M, Oresic M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. J Chromatogr A 2007; 1158(1-2): 318-28.
- Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 1966; 56(1): 236-42.

16. Fu X, Kimura M, Iga M, Yamaguchi S. Gas chromatographic-mass spectrometric screening for organic acidemias using dried urine filter paper: determination of alpha-ketoacids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 758(1): 87-94.
17. Fang-Hoffmann J, Lindner M, Shahbek N, Baric I, Hoffmann GF, Al Thani Gh, et al. Metabolic medicine: new developments in diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *World J Pediatr* 2006; 2(3): 169-76.
18. Guneral F, Bachmann C. Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population. *Clin Chem* 1994; 40(6): 862-6.
19. Chalmers RA, Healy MJ, Lawson AM, Hart JT, Watts RW. Urinary organic acids in man. III. Quantitative ranges and patterns of excretion in a normal population. *Clin Chem* 1976; 22(8): 1292-8.
20. Lawson AM, Chalmers RA, Watts RW. Urinary organic acids in man. I. Normal patterns. *Clin Chem* 1976; 22(8): 1283-7.
21. Bjorkman L, McLean C, Steen G. Organic acids in urine from human newborns. *Clin Chem* 1976; 22(1): 49-52.
22. Thompson JA, Miles BS, Fennessey PV. Urinary organic acids quantitated by age groups in a healthy pediatric population. *Clin Chem* 1977; 23(9): 1734-8.
23. Wittmann G, Karg E, Muhl A, Bodamer OA, Turi S. Comparison of tetrahydrofuran and ethyl acetate as extraction solvents for urinary organic acid analysis. *J Inher Metab Dis* 2008; 31(1): 73-80.
24. Suh JW, Lee SH, Chung BC. GC-MS determination of organic acids with solvent extraction after cation-exchange chromatography. *Clin Chem* 1997; 43(12): 2256-61.
25. Hoffmann G, Aramaki S, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L. Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Clin Chem* 1989; 35(4): 587-95.
26. Sweetman L. Qualitative and quantitative analysis of organic acids in physiologic fluids for diagnosis of the organic acidurias. In: Nyhan WL, editor. *Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine*. Norwalk, CA: Appleton and Lange; 1984. p. 419-53.
27. Kuhara T. Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 781(1-2): 497-517.
28. Kimura M, Yamamoto T, Yamaguchi S. Automated metabolic profiling and interpretation of GC/MS data for organic acidemia screening: a personal computer-based system. *Tohoku J Exp Med* 1999; 188(4): 317-34.
29. Shoemaker JD, Elliott WH. Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *J Chromatogr* 1991; 562(1-2): 125-38.
30. Hori D, Hasegawa Y, Kimura M, Yang Y, Verma IC, Yamaguchi S. Clinical onset and prognosis of Asian children with organic acidemias, as detected by analysis of urinary organic acids using GC/MS, instead of mass screening. *Brain Dev* 2005; 27(1): 39-45.
31. Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA, Johnson RW, Naylor EW. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. *Clin Chem* 2001; 47(11): 2040-4.

Establishment of Reference Ranges and Profile of Urinary Organic Acids in Different Pediatric Age Groups of the Iranian Healthy Population

Azam Dadkhah¹, Mahin Hashemipour MD², Afshin Fassihi PhD³,
Bahara Barati PharmD⁴, Morteza Pourfarzam PhD¹

Original Article

Abstract

Background: Organic acidurias are a heterogenous group of inherited metabolic disorders characterized by the accumulation and urinary excretion of organic acids. Delay in the detection and treatment of many of these disorders may lead to permanent brain damage or death. Accurate and early diagnosis is therefore paramount. The diagnosis of these disorders is achieved by the analysis of organic acids in the urine using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Since genetic and environmental factors and feeding habits can affect the concentration and profile of organic acids, for each population, data should be collected appropriate to that population. Such data did not exist for the Iranian population and thus, needed to be collected.

Methods: 140 random urine samples were collected from healthy children in 4 age groups: term neonates (< 30 days), premature neonates, infants (1 month-2 years), and children (> 2 years). In addition, urine samples were collected from 10 children with classical symptoms of inherited metabolic disorders. After extraction and preparation of trimethylsilyl derivatives, organic acids were analyzed using GC/MS.

Findings: 61 organic acids in 140 healthy urine samples were measured and the results were reported as the 2.5th-97.5th percentiles. These compounds were normal components of urine and some marker of diseases. In addition, among 10 samples collected from patients suspected of a metabolic disease, 2 patients with methyl malonic acidemia, 1 patient with propionic acidemia and 1 patient with glutaric acidemia type 2 were identified.

Conclusion: Urinary organic acid analysis is not currently performed in Iran and samples are sent abroad for investigation. In addition, no reference ranges for urinary organic acids in healthy Iranian children is available. This article, for the first time, reported the urinary organic acid analysis using GC/MS and reference ranges for the Iranian population. Urinary organic acids can now be analysed and results become available within the same day of patient admission in order to initialize early and targeted treatment. This study shows that metabolic disorders do exist in high proportion of patient with clinical signs and it appears that these diseases are prevalent. It also seems that methyl malonic acidemia is the most common disorder in patient with classic symptoms of organic acidemia in Iran.

Keywords: Urinary organic acids, Inborn errors of metabolism, Gas chromatography-mass spectrometry, Reference range

Citation: Dadkhah A, Hashemipour M, Fassihi A, Barati B, Pourfarzam M. **Establishment of Reference Ranges and Profile of Urinary Organic Acids in Different Pediatric Age Groups of the Iranian Healthy Population.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 417-31

* This paper is derived from a MSc thesis No. 389495 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Departments of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Professor, Departments of Paediatrics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Departments of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Pharmacist, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Morteza Pourfarzam PhD, Email: pourfarzam@pharm.mui.ac.ir

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی ژن NS دو جدایه‌ی آنفلوآنزای H۹N۲ و بررسی خصوصیات رشد این ویروس‌ها بر روی سلول‌های A۵۴۹

دکتر شهلا شاهسوندی^۱، عباس احمدی و سمه‌جانی^۲، محمد شایسته‌پور^۳، کاوه صادقی^۴،
دکتر محمد مجید ابراهیمی^۱، هادی فاضل^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H۹N۲ در طول دو دهه‌ی گذشته در آسیا به صورت پانزوتیک در آمده است. این ویروس، علاوه بر ایجاد بیماری در طیور پرورشی، چندین مورد ابتلای انسانی در آسیا را سبب شده است. این مطالعه به منظور بررسی ارتباط فیلوژنی ژن غیر ساختمانی (NS یا Non structural) و خصوصیات رشدشان بر روی سلول‌های A۵۴۹ در جدایه‌هایی در استان تهران انجام شد.

روش‌ها: از میان ویروس‌های ایزوله شده در سال‌های ۹۱-۱۳۸۸ ویروس آنفلوآنزای H۹N۲، دو ویروس که در درخت فیلوژنتیک جایگاه‌های متفاوتی با هم داشتند، انتخاب شدند و ژن NS طی واکنش RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) تکثیر شد. قطعه‌ی مورد نظر هر جدایه، کلون گردید و پلاسمیدهای حاصل توالی‌یابی شدند. بروز تغییرات احتمالی در توالی ژن NS جدایه‌های مورد نظر با مقایسه با جدایه‌های ثبت شده در پایگاه داده GenBank ارزیابی شد. بر اساس نتایج، رشد این دو جدایه در سلول‌های A۵۴۹ بررسی شد. ارزش GC_{۳۵} و مقایسه‌ی میزان جایگزینی Ka/Ks در نواحی رمز دهنده‌ی ژن بررسی شد.

یافته‌ها: پردازش اولیه‌ی داده‌های فیلوژنی نشان داد که ژن NS ویروس‌های ایران با همسانی ۹۶/۴ درصد به زیر دودمان Y۴۳۹ و آل A تعلق دارند. این ویروس‌ها بر اساس زمان جداسازی در دو زیر گروه زیر گروه یک شامل ویروس‌های جدا شده از طیور پرورشی طی سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۸ و زیر گروه دوم ویروس‌های جدا شده طی سال‌های ۱۱-۲۰۰۶ قرار گرفتند. ارزش GC_{۳۵} بین ۰/۳۷۱-۰/۳۹۲ متغیر بود و میزان Ka/Ks برای زیر گروه اول ۰/۳۸ و برای زیر گروه دوم ۰/۴۲ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: پردازش توالی اسید آمینه‌ی NS نشان می‌دهد که این دو ایزوله، دارای توالی KSLR در محل دمین PDZ خود هستند و چندین تغییر همزمان در طول توالی اسید آمینه رخ داده است. عیار دو ویروس به روش ارزیابی پلاک برآورد شد که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. این داده‌ها نشان می‌دهد که دو ویروس H۹N۲ جدید ایران دچار تغییرات بسیار اندکی شده‌اند.

واژگان کلیدی: آنفلوآنزای پرندگان، H۹N۲، ژن Non structural، رده‌ی سلولی A۵۴۹

ارجاع: شاهسوندی شهلا، احمدی و سمه‌جانی عباس، شایسته‌پور محمد، صادقی کاوه، ابراهیمی محمد مجید، فاضل هادی. تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی ژن NS دو جدایه‌ی آنفلوآنزای H۹N۲ و بررسی خصوصیات رشد این ویروس‌ها بر روی سلول‌های A۵۴۹. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۴۱-۴۳۲

۱- استادیار، گروه آنفلوآنزای طیور، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه میکروپزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آنفلوآنزای طیور، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

مقدمه

بیماری آنفلوانزا به وسیله‌ی ویروس‌های دارای RNA از خانواده‌ی ارتومیکسوویریده ایجاد می‌شود و طیف میزبانی وسیعی از جانوران شامل پرندگان و پستانداران را مبتلا می‌کند (۱-۲). این ویروس‌ها در سه تیپ A، B و C طبقه‌بندی می‌شوند. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A، ۱۱ پروتئین شامل گلیکوپروتئین‌های سطحی HA، NA، نوکلئوپروتئین (NP یا Nucleolar protein)، ماتریکس (M₁، M₂)، پروتئین غیر ساختاری (NS یا Non structural) (NS₁، NS₂) و پروتئین‌های پلی‌مرازی PA، PB₁، PB₂ و PB₁-F₂ را رمزدهی می‌کنند (۳-۴، ۱). ویروس‌های این تیپ بر اساس گلیکوپروتئین‌های HA و NA به ۱۶ تیپ H و ۹ تیپ N طبقه‌بندی می‌شوند (۳-۴، ۱).

تحت تیپ H₉N₂ در آسیا، طی یک دوره‌ی طولانی (۸۵-۱۹۷۵) از اردک‌ها در هنگ‌کنگ و سپس در دهه‌ی ۱۹۹۰ به طور گسترده‌ای از طیور پرورشی جدا شد (۵). قابلیت انتقال مستقیم ویروس H₉N₂ به انسان برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ در هنگ‌کنگ گزارش شد (۷-۵). اگر چه هر ۸ قطعه ژن ویروس‌های آنفلوانزا در ایجاد بیماری دخالت دارند، اما تأثیر تغییرات سه ژن HA، NS و PB₂ در ایجاد سویه‌هایی با توان بیماری‌زایی در مطالعات متعدد مشخص شده است.

پروتئین NS₁ دارای چندین عملکرد از جمله تنظیم موقت ساخت RNA ویروسی و مهار پردازش mRNA (Messenger RNA) ویروسی را بر عهده دارد و مهم‌ترین آن‌ها ممانعت از پاسخ ضد ویروسی میزبان با سرکوب تولید اینترفرون نوع I برای حصول

اطمینان از تکثیر مناسب ویروس در سلول است (۸-۹). پروتئین NS به دو گروه آلی A و B تقسیم می‌شود که آل A به ویروس‌های آنفلوانزای انسانی، خوک، اسب و بعضی از ویروس‌های پرندگان تعلق دارد، در حالی که آل B منحصر به ویروس پرندگان است (۱۰-۱۲).

مطالعه‌ی حاضر با هدف توالی‌یابی و بررسی فیلوژنی ژن NS جدایه‌های SS₂/۲۰۰۸ و SS_۸/۲۰۱۱ ویروس آنفلوانزای H₉N₂ و خصوصیات رشدشان در سلول‌های انسانی A549 انجام شد.

روش‌ها

استخراج RNA و آزمایش RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

برای استخراج RNA ویروس‌های آنفلوانزای H₉N₂ تهیه شده از نای طیور آلوده، از کیت High pure RNA isolation (Roche, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner پرایمرهای اختصاصی برای تعیین قطعه‌ی کامل ژن NS به طول ۸۹۰ bp با توالی زیر طراحی شدند. برای کلون‌سازی ژن در وکتور pTZ57R/T (Fermentas, Germany)، آنزیم‌های برش دهنده‌ی XhoI در ابتدای پرایمر رفت و آنزیم BamHI در انتهای پرایمر برگشت در نظر گرفتند (F- (۳-)).
 CTCGAGAGCAAAAAGCAGGGTGACAAA
 GGATCCAGTAGAAACAAGG ۳' و ۵'-AC
 GTGTTTTTA- (۵'-R).
 آزمایش RT-PCR با استفاده از کیت

شد (۱۳). پروتوتیپ‌های ویروس H9N2 شامل G1، G9 و Y430 به عنوان شاخص در نظر گرفته شدند. احتمال بروز انتخاب مثبت در این ژن‌ها با مقایسه‌ی الگوی جایگزینی نوکلئوتیدهای غیر مترادف به مترادف که میزان $\omega = Ka/Ks$ در نظر گرفته می‌شود، در نواحی رمز دهنده‌ی ژن با استفاده از Bayesian و پارامتر $1 \geq \omega + \beta$ و تناوب تغییر در سومین نوکلئوتید هر کدون (GC₃s) با استفاده از روش اصلاح شده‌ی Nei-Gojobori تعیین شد (۱۴).

کشت ویروس آنفلوانزا بر روی سلول A549

رده‌ی سلولی A549 (ATCC No CCL-185TM) از بانک سلول انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ظرف کشت سلول مدت چهار روز در دمای °C ۳۷ و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد تا به حد مناسب پاساژ (۹۰-۸۰ درصد تراکم سلولی) برای کشت برسد. سپس برای ارزیابی پلاک برای هر ویروس، دو پلیت ۶ خانه‌ای با تراکم سلولی 5×10^5 /ml آماده شد. رقت‌های متوالی ۱۰^{-۸} تا ۱۰^{-۱} از هر ویروس، از کشت و خالص‌سازی بر روی تخم مرغ‌های SPF (Specific pathogen free) تهیه شد و برای هر رقت، دو چاهک و برای شاهد منفی یک چاهک در نظر گرفته شد.

پس از یک ساعت قرار دادن در دمای آزمایشگاه، محیط روی سلول‌های هر چاهک خارج شد و محیط Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-پلاک) به آرامی جایگزین شد. پس از بسته شدن محیط، پلیت‌ها در گرمخانه با دمای °C ۳۷ قرار داده شدند تا پلاک‌ها مشاهده و قابل شمارش شوند. با در نظر گرفتن ضریب رقت و حجم ویروس تلقیح شده در هر خانه، عیار ویروس بر مبنای واحد تشکیل دهنده‌ی پلاک در هر میلی‌لیتر (pfu/ml) محاسبه شد.

Maxime RT-PCR pre-mix (Intron biotechnology, Korea) با برنامه‌ی رونوشت‌برداری معکوس °C ۴۵ به مدت ۳۰ دقیقه، غیر فعال کردن آنزیم RT (Reverse transcriptase) در °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه‌ی واسرشت شامل °C ۹۴ به مدت ۵۰ ثانیه، تکثیر در °C ۵۷ به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه انجام شد. ۷ μL از محصول روی ژل آگارز ۱ درصد و با نشانگر مولکولی (bp Plus DNA Ladder, GeneRuler ۱۰۰ Fermentas) به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۷۰ الکتروفورز شد (شکل ۱).

تعیین توالی ژن NS

محصول DNA ژن NS هر جدایه با استفاده از وکتور InsTAclone PCR cloning کیت PTZ5VR/T (Escherichia coli) E.coli در باکتری (Fermentas) سویه‌ی DH5α کلون شد. پس از تأیید پلاسمیدهای واجد قطعه با هضم آنزیمی، پلاسمیدهای خالص شده برای تعیین توالی ارسال شدند. خوانش توالی به صورت دو طرفه و با پرایمرهای (۲۰-) M13F و (۴۰-) M13R کسه در دو انتهای MCS (Multiple cloning site) وکتور جای دارند، انجام گردید. توالی‌های کامل ژن NS دو ویروس H9N2 جدایه‌های سال‌های ۱۱-۲۰۰۸ ایران در پایگاه داده‌ی GenBank با کدهای شناسایی JX308791- و JX308789- به ثبت رسیدند.

بررسی‌های فیلوژنی

توالی ژن NS جدایه‌ها با سایر توالی‌های ثبت شده در Gene bank مقایسه شدند. با پردازش حداقل دگرگونی بر مبنای Maximum Likelihood و یک هزار بار تکرار با نرم‌افزار MEGA۴ نسخه‌ی ۴ رسم

یک مورد استثنا) و زیر گروه دوم ویروس‌های جدا شده طی سال‌های ۱۱-۲۰۰۶ هستند. تمامی جدایه‌های ایران به آل A تعلق دارند.

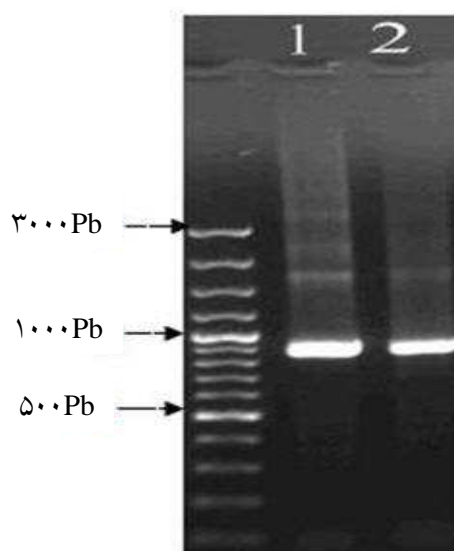
برای ارزیابی تکامل ژن NS در ویروس‌های H9N2 ایران، انتخاب مثبت با محاسبه‌ی ارزش GC_{3s} و مقایسه‌ی میزان جایگزینی Ka/Ks در نواحی رمز دهنده‌ی ژن بررسی شد. ارزش GC_{3s} از ۰/۳۷۱ تا ۰/۳۹۲ متغیر بود و عدد کمتر از واحد نشان دهنده‌ی این است که تغییر کدون‌ها در ژن NS بسیار کم رخ داده است. میزان Ka/Ks، برای زیر گروه اول ۰/۳۸ و برای زیر گروه دوم ۰/۴۲ محاسبه شد. میزان کمتر از یک بیانگر این است که در روند دگرگونی ژن NS این ویروس‌ها، انتخاب منفی غالب است؛ بدین معنی که این ژن دگرگونی کمی پیدا کرده و میزان آن در جدایه‌های سال‌های ۲۰۰۶ به بعد اندکی بیشتر از جدایه‌های قبل است.

برای درک دینامیک جهش ژن، توالی اسید آمینه‌ی NS ویروس‌های این زیر دودمان بر مبنای توالی نوکلئوتیدی آن تهیه شد. پردازش توالی‌ها نشان می‌دهد که همگی این ویروس‌ها دارای توالی KSLR در محل دمین PDZ خود هستند که مشخصه‌ی ویروس‌های H9N2 است. موتیف DRLRRDQKSLR در NLS₁ موقعیت ۴۴-۳۴ به طور کامل حفظ شده است. چندین تغییر همزمان در NS ویروس‌های زیرگروه دو ایران به‌طور ثابت رخ داده‌اند. این تغییرات بیانگر وجود محل‌هایی هستند که احتمال بروز انتخاب مثبت در آن‌ها وجود دارد و شامل موقعیت‌های: R55E، S8VP، T112A، N139D، A143T، E223A و K245E هستند. رخداد انتخاب مثبت در کدون‌ها ارزیابی شد. با مقایسه‌ی دو

عیار دو ویروس در رده‌ی سلولی A549 به روش ارزیابی پلاک تعیین شد. میانگین پلاک‌های تشکیل شده بر روی سلول از مجموع میانگین سه نوبت آزمایش و انحراف معیار با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) به دست آمد.

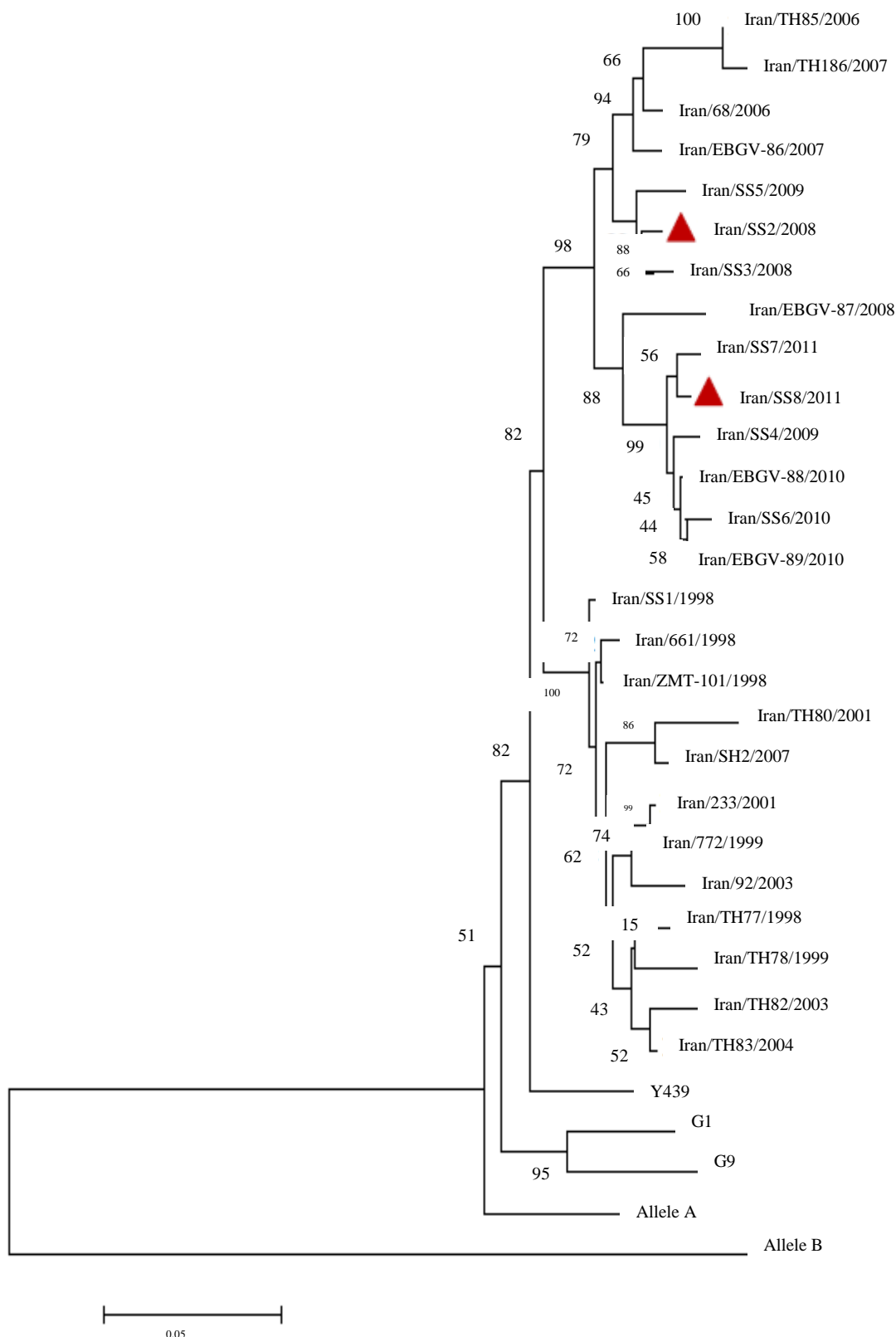
یافته‌ها

محصول PCR ژن NS ویروس‌های H9N2 ویروس آنفلوانزا با طول ۸۹۰ bp بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

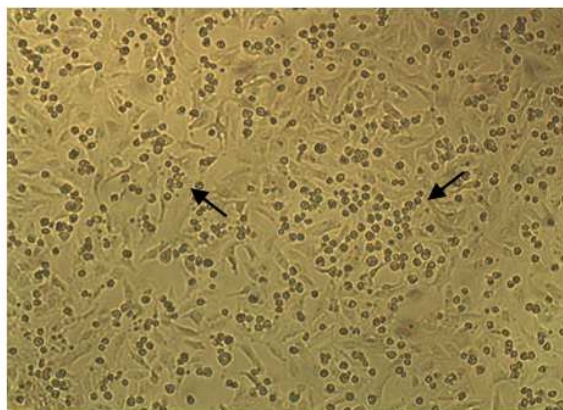


شکل ۱. الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NS ویروس آنفلوانزای H9N2 با ۱۰۰ bp Ladder. ۱: SS2/2008، ۲: SS8/2011

پردازش اولیه‌ی داده‌های فیلوژنی در شکل ۲ نشان می‌دهد که در توالی ژن NS ویروس آنفلوانزای H9N2 جدایه‌ها به زیر دودمان Y439 تعلق دارند و ارتباط نزدیک بین آن‌ها با ۹۶/۴ درصد همسانی وجود دارد. جدایه‌های ایران در دو زیر گروه قرار می‌گیرند: زیر گروه یک شامل ویروس‌های جدا شده از طیور پرورشی طی سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۸ (به جز



شکل ۲. درخت فیلوژنی بر اساس توالی ژن NS ویروس‌های آنفلوانزای H₉N₂ که با استفاده از MEGA ترسیم شده است (▲ ویروس‌های آنفلوانزای H₉N₂ جدا شده در این مطالعه)



ب



الف

شکل ۳. سلول A549. الف) سلول‌های شاهد، ب) سلول‌های آلوده شده با ویروس آنفلوآنزای H9N2. علامت آسیب سلولی شامل بزرگ شدن و دانه‌دار شدن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت مشاهده می‌شوند که با فلش سیاه رنگ نشان داده شده‌اند (بزرگ‌نمایی $\times 10$)

آماری تفاوت معنی‌داری ($P < 0/01$) با هم نداشتند.

بحث

در چند سال اخیر، انتشار گسترده‌ی ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان در کشورهای مختلف و انتقال مستقیم آن‌ها به جمعیت‌های انسانی، باعث نگرانی در سطح افکار عمومی جهان شده است. تمام تحت تیپ‌های ویروس آنفلوآنزای A در پرندگان آبزی و مهاجر وجود دارند و قادرند به انسان نیز منتقل شوند. خطر گسترش آنفلوآنزای پرندگان که عامل آن به طور مستقیم به انسان منتقل می‌شود، عواقب اجتماعی و اقتصادی بسیاری را در پی خواهد داشت (۱۶-۱۵). عواملی مانند پتانسیل ویروس‌های تحت حاد برای تبدیل به ویروس‌های فوق حاد، انتقال ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به انسان و کسب پتانسیل انتقال فرد به فرد سبب شده‌اند تا رخدادهای آنفلوآنزا در پرندگان اهلی تحت کنترل قرار گیرند.

مطالعات نشان داده‌اند چنانچه در میزبان حیوانی تغییری در اسیدهای آمینه مسئول شناسایی و تنظیم

زیر گروه، یک موقعیت با احتمال رخداد بیش از ۰/۵ مشخص شد که نزدیک انتهای آمینی NLS (Nuclear localization sequence) در موقعیت ۲۲۳ قرار دارد. برآورد انتخاب مثبت با تعیین رادیکال و یا خنثی بودن جایگزینی اسیدهای آمینه تأیید شد. بیشترین جایگزینی در اسیدهای آمینه‌ی NS این ویروس‌ها از نوع رادیکال است که در نتیجه‌ی انتخاب منفی حذف می‌شوند. این انتخاب منفی، تناوب تنوع را کاهش می‌دهد.

سلول‌های A549 با دو ویروس H9N2 جدایه‌های NS و ترسیم درخت در دو مکان مجزا قرار گرفته‌اند، آلوده شدند. با توجه به شکل ۳، در نتیجه‌ی آلوده‌سازی، علامت آسیب سلولی شامل بزرگ شدن و دانه‌دار شدن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C قابل مشاهده بودند.

برای جدایه‌ی SS2/2008 عیار ویروس (PFU یا plaque forming unit) $4/34 \pm 0/20$ و برای جدایه‌ی SS8/2011 عیار $4/52 \pm 0/20$ برآورد شد که از نظر

رسیده‌اند، مقایسه گردیدند. این ویروس‌ها بر اساس زمان جداسازی در دو زیر گروه قرار می‌گیرند. اگر چه بین آن‌ها همسانی بسیار زیادی وجود دارد. میزان کمتر از یک برای Ka/Ks بیانر این است که در روند تکامل ژن NS ویروس‌های ایران انتخاب منفی غالب است و عدد کمتر از واحد در ارزش GC_{3s} نشان دهنده‌ی این است که تغییر کدون‌های اسید آمینه در آن بسیار کم رخ داده است.

طبق درخت فیلوژنی رسم شده در شکل ۲، در زیر گروه دو، سه جدایه‌ی سال‌های ۲۰۰۸-۰۹ در یک دسته قرار می‌گیرند. در حالی که بقیه با ویروس‌های ۲۰۱۰ یک دسته‌ی مجزا را تشکیل می‌دهند (۲۲-۲۰). این تفاوت بین جدایه‌های سال‌های ۲۰۰۸-۱۱ این مسأله را بر می‌انگیزد که «آیا فشارهای انتخابی ناشی از وجود تحت تیپ‌های دیگر، بار ایمنی ناشی از واکنش‌های همسایه، سبب تغییر در پرنده‌گان آبری از کشورهای همسایه، سبب تغییر در آسیب‌زایی ویروس و سازگاری آن با میزبان جدید شده است؟». برای این منظور، سلول‌های A549 با دو جدایه‌ی SS2/2008 و SS8/2011 که در درخت فیلوژنی در دو مکان مجزا قرار گرفته‌اند، آلوده شدند. با توجه به شکل ۳، نتیجه‌ی آلوده‌سازی برای هر دو یکسان بود و علایم آسیب سلولی مشابه شامل بزرگ شدن و دانه‌دار شدن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون مشاهده شدند که نظر آماری عیار ویروس‌ها تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند.

به دنبال ظهور ویروس H₉N₂ در آسیا از دهه‌ی ۱۹۹۰، تغییرات زیادی در ژن‌های این ویروس به ویژه از کشور چین گزارش شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که این ویروس علاوه بر توانایی اتصال

اختصاصی بودن اتصال ویروس به گیرنده از ۵۲،۶ به ۵۳،۲ در پروتئین HA ایجاد شود، یا سرین با پرولین در موقعیت ۴۲، اسید گلوتامیک در جایگاه ۹۲ و جایگزینی اسید آمینه‌ی آلانین با والین در موقعیت ۱۴۹ پروتئین NS_۱ صورت گیرد، که سبب توانایی ویروس برای فرار از پاسخ‌های ضد ویروسی سیتوکینی میزبان شود و یا در جایگاه‌های ۶۲۷ و ۷۰۱ پروتئین PB_۲ جهش رخ دهد، ویروس توانایی جدیدی برای تطبیق با میزبان جدید و انتشار آلودگی کسب می‌نماید (۱۷).

اتفاق نظری وجود دارد که تحت تیپ H₉N₂ در مناطق وسیعی از آسیا بومی است و توانایی انتشار جهانی را دارد (۱۹-۱۸). چون ایران در دو مسیر مهاجرت پرنده‌گان آبری (آسیای غربی- آفریقای شرقی و دریای سیاه- مدیترانه) قرار دارد؛ برای کاهش احتمال پدیده‌ی بازآرایی و یا نوترکیبی با ویروس H₅N_۱ و جلوگیری از بروز ژنوتیپ‌های جدید ویروس H₉N₂، باید در مورد پیشگیری و کنترل طولانی مدت بیماری آنفلوآنزای پرنده‌گان اقدام جدی و به موقع به عمل آید. برای اعمال مؤثرترین شیوه‌های پیشگیری، ضروری است که دقیق‌ترین داده‌های علمی درباره‌ی ویروس عامل آنفلوآنزای پرنده‌گان وجود داشته باشد.

در این پژوهش برای ارزیابی تغییرات احتمالی در ژن‌های مسؤو آسیب‌زایی و تطبیق با میزبان انسانی، بر روی ۲ ویروس آنفلوآنزای H₉N₂ که در سال‌های ۲۰۰۸-۱۱ از موارد ابتلای طیور پرورشی جدا شده بودند، بررسی لازم صورت گرفت. بر این اساس، ژن NS در وکتور انتقال و تعیین توالی شده و با سایر جدایه‌های ایران که از سال ۱۹۹۸ تا کنون به ثبت

H9N2 در منطقه‌ی آسیا (۲۵) و توانایی سازگاری این ویروس با میزبان‌های مختلف به ویژه خوک و انسان، مطالعه‌ی مستمر ژنومی این ویروس و بررسی دینامیک تغییرات احتمالی در سازش یافتن با میزبان جدید ضروری به نظر می‌رسد.

می‌توان چنین نتیجه گرفت که ویروس‌های H9N2 ایران در ژن NS خود دچار جهش‌های نقطه‌ای شده‌اند و این تغییرات بیشتر به حالت انتخاب منفی بوده است. در جایگاه‌های ۴۲، ۹۲ و ۱۴۹ پروتئین NS، تغییراتی که باعث افزایش تکثیر و بیماری‌زایی ویروس می‌شود، رخ نداده است. همچنین داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف اندکی بین ویروس‌های H9N2 ایران وجود دارد و تغییرات ژنتیکی به سمت میزبان انسانی در ایزوله‌های ایران مشاهده نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

منابع مالی اجرای این پژوهش توسط مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین گردیده است. بدین وسیله از این دست اندر کاران این مؤسسه و نیز سرکار خانم دکتر مسعودی و جناب آقایان دکتر بخشش که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

به گیرنده‌های اختصاص یافته برای طیور، به علت بروز جهش در گلیکوپروتئین‌های سطحی، توانایی اتصال به گیرنده‌های NeuAcα۶،۲Gal سویه‌های انسانی را نیز کسب کرده است و توانایی انتقال مستقیم به انسان را دارد.

در سال‌های اخیر، علاوه بر تغییرات ژنومی در گلیکوپروتئین‌های سطحی این ویروس، ژن‌های NS۱ و PB۲ نیز دستخوش تغییر شده و ژنوتیپ‌های متعدد H9N2 از پاکستان (۲۲)، چین (۲۳) و هند (۲۴) گزارش شده‌اند. از نظر فیلوژنی، جدایه‌های چین بر خلاف ویروس‌های ایران و پاکستان، به زیر دودمان G۱ تعلق دارند (۲۵). فشار انتخابی در NS که یک پروتئین غیر ساختمانی است و به میزان بسیار کمی تحت فشار ایمنی قرار می‌گیرد، توجیه کننده‌ی این تغییرات نیست و می‌توان بروز جهش‌های نقطه‌ای و وقوع پدیده‌ی بازآرایی ژنی در نتیجه‌ی مهاجرت پرندگان را مورد توجه قرار داد (۲۶، ۲۱-۲۰، ۱۵).

Iqbal و همکاران (۲۲) ظهور ژنوتیپ جدید H9N2 را در پاکستان گزارش کردند که ژن NS آن دستخوش بازآرایی با تحت تیپ HVN۳ شده بود. با در نظر گرفتن شباهت بین جدایه‌های ایران با جدایه‌های پاکستان (۲۲) وجود ژنوتیپ‌های متعدد

References

1. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1533-79.
2. Skehel JJ, Waterfield MD. Studies on the primary structure of the influenza virus hemagglutinin. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72(1): 93-7.
3. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992; 56(1): 152-79.
4. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. Bull World Health Organ 1980; 58(4): 585-91.
5. Shortridge KF. Pandemic influenza: a zoonosis? Semin Respir Infect 1992; 7(1): 11-25.
6. Cameron KR, Gregory V, Banks J, Brown IH, Alexander DJ, Hay AJ, et al. H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong. Virology

- 2000; 278(1): 36-41.
7. Butt KM, Smith GJ, Chen H, Zhang LJ, Leung YH, Xu KM, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5760-7.
 8. Wang W, Riedel K, Lynch P, Chien CY, Montelione GT, Krug RM. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA* 1999; 5(2): 195-205.
 9. Nemeroff ME, Qian XY, Krug RM. The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. *Virology* 1995; 212(2): 422-8.
 10. Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, Zheng H, Donelan N, Planz O, et al. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol* 2002; 76(21): 11166-71.
 11. Ludwig S, Schultz U, Mandler J, Fitch WM, Scholtissek C. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* 1991; 183(2): 566-77.
 12. Treanor JJ, Snyder MH, London WT, Murphy BR. The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology* 1989; 171(1): 1-9.
 13. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8): 1596-9.
 14. Shapiro GI, Krug RM. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* 1988; 62(7): 2285-90.
 15. Choi YK, Ozaki H, Webby RJ, Webster RG, Peiris JS, Poon L, et al. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *J Virol* 2004; 78(16): 8609-14.
 16. Kwon JS, Lee HJ, Lee DH, Lee YJ, Mo IP, Nahm SS, et al. Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. *Virus Res* 2008; 133(2): 187-94.
 17. Monne I, Ormelli S, Salviato A, De BC, Bettini F, Salomoni A, et al. Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1769-73.
 18. Das A, Suarez DL. Development and bench validation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction protocols for rapid detection of the subtypes H6, H9, and H11 of avian influenza viruses in experimental samples. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19(6): 625-34.
 19. Gall A, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Hoper D, Beer M. Design and validation of a microarray for detection, hemagglutinin subtyping, and pathotyping of avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2): 327-34.
 20. Nili H, Asasi K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol* 2002; 31(3): 247-52.
 21. Nili H, Asasi K. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian Dis* 2003; 47(3 Suppl): 828-31.
 22. Iqbal M, Yaqub T, Reddy K, McCauley JW. Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses. *PLoS One* 2009; 4(6): e5788.
 23. Bi J, Deng G, Dong J, Kong F, Li X, Xu Q, et al. Phylogenetic and molecular characterization of H9N2 influenza isolates from chickens in Northern China from 2007-2009. *PLoS One* 2010; 5(9).
 24. Butt AM, Siddique S, Idrees M, Tong Y. Avian influenza A (H9N2): computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population. *Virology* 2010; 7: 319.
 25. Fazel H, Shahsavandi S, Masoudi S, Ebrahimi M, Taghizadeh M. Evolutionary characterization of non-structural gene of H9N2 influenza viruses isolated from Asia during 2008-2012. *Comp Clin Pathol* 2014; 23(3): 523-8.
 26. Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 2001; 281(2): 156-62.

Sequencing and Phylogenetic Analysis of NS Gene of Two Isolates of H9N2 Influenza Virus and the Growth Characteristics of the Virus on A549 Cells

Shahla Shahsavandi PhD¹, Abbas Ahmadi-Vasmehjani², Mohammad Shayestehpour MSc³, Kaweh Sadeghi MSc⁴, Mohammad Majid Ebrahimi PhD¹, Hadi Fazel MSc³

Original Article

Abstract

Background: Avian influenza virus of H9N2 subtype has become panzootic during the last two decades in Asia. In addition to causing disease in poultry, this virus has been identified as the reason for several human diseases in Asia. The present study aimed to investigate the phylogenetic relationship between NS gene of two viruses (SS2\2008 and SS8\2011) and other Iranian isolated viruses, and we characterized the growth ability of two viruses in human A549 cell.

Methods: Among the H9N2 viruses isolated from 2008 to 2011, two isolated were placed in different positions in the phylogenetic tree. The whole NS gene fragments of two virus isolates were amplified using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method; the fragment of each isolate was cloned and then sequenced. Possible changes in the NS gene sequence of isolates were compared with subtypes registered in Gene Bank Database and their growth abilities in human A549 cells were evaluated. GC_{3s} value and replacement rate of Ka/Ks value in NS gene locus were compared.

Findings: The initial phylogenetic process revealed that the NS gene of Iranian isolates had a homology of 96.4% belonging to clade Y439 and Allele A. These viruses, based on the time of isolation, were divided into two subgroups of viruses isolated from poultry during the years 1998-2004 and viruses isolated during a time course of the years 2006-2011. GC_{3s} value varied between 0.371-0.392 and the Ka/Ks value NS gene locus was 0.38 and 0.42 in subgroups 1 and 2, respectively.

Conclusion: Processing of NS amino acid sequence not only exhibited that these two isolates contained KSLR sequence in their PDZ domain and but also it revealed that multiple simultaneous changes had been occurred. The viruses titers of two isolates, based on plaque assay, were not statistically significant. These data demonstrate that two Iranian H9N2 isolates are affected by some genetic drifts.

Keywords: Avian influenza, H9N2 subtype, PDZ domain

Citation: Shahsavandi Sh, Ahmadi-Vasmehjani A, Shayestehpour M, Sadeghi K, Ebrahimi MM, Fazel H. **Sequencing and Phylogenetic Analysis of NS Gene of Two Isolates of H9N2 Influenza Virus and the Growth Characteristics of the Virus on A549 Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 432-41

1- Assistant Professor, Department of Avian Influenza, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

2- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

3- PhD Student, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Avian Influenza, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Corresponding Author: Hadi Fazel MSc, Email: hadi.fazel@gmail.co

بررسی پلی مورفیسم ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ارتباط آن با رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در اهواز

دکتر جواد محمدی اصل^۱، ارغوان سلیمانی زاده^۲، دکتر حاجیه بی بی شهبازیان^۳،
دکتر حشمت اله شهبازیان^۴، ندا گلچین^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دیابت شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غیر واگیر دنیا است که سالانه افراد زیادی را درگیر می‌کند. جمعیت فراوانی از افراد، از ابتلا به دیابت از نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی رنج می‌برند. استرس‌های اکسیداتیو در بروز این دو عارضه نقش به‌سزایی دارند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD یا Superoxide dismutase) نقش عمده‌ای در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن دارند. بنابراین، یک نقش محافظتی علیه نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی دارد. مطالعات مختلفی تأثیر پلی مورفیسم‌های مختلف این ژن را در بروز آسیب‌های بافتی افراد دیابتی آشکار کرده‌اند.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ۱۴۵ نفر از افراد بیمار (گروه مورد) و ۱۴۵ نفر از افراد سالم (گروه شاهد)، بررسی شد. نمونه‌های DNA بعد از جمع‌آوری نمونه‌ی خون افراد مورد و شاهد استخراج شد و پلی مورفیسم نمونه‌ها با به کارگیری روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با بررسی پلی مورفیسم rs2۰۷۰۴۲۴ در افراد مورد و شاهد مبتلا به نفروپاتی، توزیع فراوانی ژنوتیپی معنی‌داری مشاهده شد ($P = ۰/۰۰۵$) و $\chi^2 = ۷/۵۵$. در حالی که در افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی، توزیع این پلی مورفیسم ارتباط معنی‌داری نشان نداد. از آن جا که در پلی مورفیسم rs2۲۳۴۶۹۴ تمام افراد بیمار مورد مطالعه دارای ژنوتیپ AA بودند، بنابراین هیچ گونه آزمون آماری برای بررسی ارتباط بین این پلی مورفیسم و نفروپاتی دیابتی و رتینوپاتی دیابتی قابل انجام نبود.

نتیجه‌گیری: توصیه می‌شود افرادی که در مراحل اولیه‌ی دیابت شناسایی می‌شوند، آزمایش بررسی مولکولی برای بررسی این پلی مورفیسم انجام شود تا افراد مستعد به ابتلا به نفروپاتی دیابتی مشخص شوند و اقدامات درمانی مناسب برای آن‌ها صورت گیرد.

واژگان کلیدی: دیابت ملیتوس، ژن Superoxide dismutase، پلی مورفیسم، ژنتیک، مطالعه‌ی مورد-شاهدی

ارجاع: محمدی اصل جواد، سلیمانی‌زاده ارغوان، بی‌بی شهبازیان حاجیه، شهبازیان حشمت اله، گلچین ندا. بررسی پلی مورفیسم ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ارتباط آن با رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در اهواز. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۴۲-۴۴۳

۱- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، آزمایشگاه ژنتیک نور، اهواز، ایران

۳- استادیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار، گروه ارولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۵- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، آزمایشگاه ژنتیک نور، اهواز، ایران

مقدمه

دیابت نوع ۲ شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز است که بیش از ۲۰۰ میلیون نفر را در سراسر جهان درگیر کرده است (۱). دیابت شیرین، گروهی از اختلالات متابولیک را شامل می‌شود که از نظر بالا بودن قند خون (هایپرگلیسمی) با هم مشترک هستند (۲). این نوع بیماری، یک اختلال مزمن و پیش‌رونده‌ای است که ناشی از مقاومت به انسولین، کاهش عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و افزایش تولید گلوکز توسط کبد می‌باشد (۳-۴).

با توجه به آمار ارایه شده در سال ۲۰۰۰ توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO یا World Health Organization)، حداقل ۱۷۱ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به دیابت قندی بوده‌اند (۵). ۶۰ درصد از این افراد، دچار یکی از عوارض دیررس این بیماری می‌گردند که در هر ۱۰ ثانیه، باعث مرگ یک انسان می‌شوند (۶). بر طبق گزارش ارایه شده توسط سازمان جهانی بهداشت، ۲۰ درصد از موارد مرگ و میر افراد بین ۳۵-۶۴ سال، در سال ۲۰۰۰ در ایران بر اثر ابتلا به دیابت قندی و عوارض آن اتفاق افتاده است (۷). بر اساس پیش‌بینی این سازمان، انتظار می‌رود که تعداد افراد مبتلا به در سال ۲۰۳۵ میلادی به ۳۰۰ میلیون نفر برسد (۸).

بالا بودن گلوکز خون در دیابت، عوارض وخیمی را به دنبال خواهد داشت که بسیاری از اعضای بدن را گرفتار می‌سازد و مسؤول بخش عمده‌ای از موارد ابتلا و مرگ و میر در این بیماران به شمار می‌رود. این عوارض را می‌توان به عوارض عروقی و غیر عروقی تقسیم نمود. عوارض عروقی به نوبه‌ی خود شامل عروق کوچک (نوروپاتی، نفروپاتی و رتینوپاتی) و

عروق بزرگ (قلبی و عروقی) می‌شود (۹).

نفروپاتی دیابتی، یکی از مهم‌ترین عوارض دیابت است و شایع‌ترین علت نارسایی مزمن کلیه در سراسر جهان می‌باشد (۱۰). یکی دیگر از عوارض قابل توجه و تا حدی جبران ناپذیر این بیماری، رتینوپاتی دیابتی است که ممکن است منجر به کوری شود. ۸۰ درصد از بیمارانی که ۱۰ سال یا بیشتر مبتلا به دیابت می‌باشند، ممکن است به این بیماری دچار شوند (۱۱). شواهد و یافته‌های متعددی بر نقش مؤثر عوامل ژنتیکی و زمینه‌های نژادی-وراثتی در تعیین میزان استعداد و یا مقاومت بیماران در ابتلا به رتینوپاتی و نفروپاتی دیابتی دلالت دارند (۱۲-۱۴). همان‌طور که ذکر شد، این بیماری چند ژنی و چند عاملی است. بروز این بیماری نتیجه‌ی یک تعامل پیچیده بین عوامل ژنتیکی و محیطی است. بنابراین، پیشرفت‌ها در زمینه‌ی شناسایی تغییرات ژنتیکی دیابت می‌تواند در زمینه‌ی کنترل این بیماری و عوارض ناشی از آن، کمک کننده باشد.

با وجود انجام تلاش‌های گسترده در جهت شناسایی رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، مکانیسم مولکولی آن‌ها هنوز به طور کامل و دقیق شناسایی نشده است. یکی از مهم‌ترین عوامل در این راستا، پلی مورفیسم‌های ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ (SOD1) است.

سوپراکسید دیسموتاز مس / روی معروف به سوپراکسید دیسموتاز ۱ یا SOD1 (Superoxide dismutase 1) آنزیم سیتوزولی در انسان می‌باشد که توسط ژن SOD1 با کد بین‌المللی ۶۶۴۷، کدگذاری می‌گردد (۱۵). این آنزیم یک آنتی اکسیدان قوی است که با تبدیل رادیکال‌های

بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دخیل هستند. در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌مورفیسم (rs2234694) +35A/C که در مجاورت ناحیه‌ی اسپیلیسینگ اینترون ۳/ اگزون ۳ قرار گرفت و پلی‌مورفیسم A/G (rs2070424) در ناحیه‌ی اینترونی ۳ مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها

به منظور جمع‌آوری نمونه، جمعیت مورد نظر از مراجعین به کلینیک دیابت بیمارستان گلستان اهواز که سابقه‌ی ۵ سال و بیشتر دیابت نوع ۲ داشتند، انتخاب شدند. این بیماران توسط پزشک متخصص چشم و کلیه، مورد ارزیابی قرار گرفتند و ۱۴۵ نفر از بیماران دارای نفروپاتی و رتینوپاتی، بیماران فقط دارای نفروپاتی و بیماران فقط دارای رتینوپاتی انتخاب و وارد این مطالعه شدند. گروه شاهد نیز ۱۴۵ نفر فرد سالم بودند که با همسان‌سازی آن‌ها از لحاظ سن و جنس با گروه بیمار، انتخاب شدند.

از افراد مورد مطالعه، در ابتدا تکمیل پرسش‌نامه و رضایت کتبی به منظور خون‌گیری وریدی، گرفته شد. سپس ۳ سی‌سی خون در تیوپ فالتون ۱۵ میلی‌لیتری که حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) بود، نمونه‌گیری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA از نمونه‌های خون افراد سالم و بیمار با استفاده از کیت استخراج DNA متعلق به شرکت BIOEER استخراج شد و DNA به دست آمده جهت مطالعه در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش PCR

سوپراکسید به اکسیژن و هیدروژن پراکسید، بدن را از آسیب ناشی از سوپراکسید که رادیکال آزاد سمی تولید شده در میتوکندری است، محافظت می‌کند. رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی متابولیسم سلول‌ها می‌توانند تجمع کنند و باعث صدمه به DNA میتوکندریایی، هسته و پروتئین‌های داخل سلول شوند (۱۶). شواهد بسیاری وجود دارند که اثبات می‌کنند فزونی سوپراکسید تولید شده در اثر هیپرگلاسمی دیابتی، نقش مرکزی در آسیب سلول‌های عروقی ایفا می‌کند (۷).

مشاهدات مختلف نشان داده‌اند که میزان SOD1 در ناحیه‌ی کلیوی بیماران مبتلا به دیابت کاهش پیدا می‌کند. در مدل‌های حیوانی فاقد SOD1 زخم‌های کلیوی گسترش پیدا کردند و درمان آن‌ها با SOD1 سنتزی، منجر به مهار شدن آلبومینوری و بهبود زخم‌های نفروپاتیک شد (۱۷).

بر این اساس، نقص عملکردی این آنزیم عامل کلیدی در ایجاد نفروپاتی به شمار می‌رود (۱۸). علاوه بر این، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم ژن SOD1 در ایجاد نفروپاتی دیابتی دارای نقش است (۱۹).

دخالته SOD1 در ایجاد نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی، وجود بعضی پلی‌مورفیسم‌ها که فعالیت SOD1 را کاهش می‌دهند و شواهدی دال بر استعداد ژنتیکی بیماری کلیوی دیابتی، دلیل مطالعه‌ی پلی‌مورفیسم‌های ژن SOD1 به عنوان یک عامل خطر برای نفروپاتی و رتینوپاتی در این پژوهش می‌باشد. همان‌طور که در بالا اشاره شد، هر دوی این پلی‌مورفیسم‌ها با فعالیت SOD1 در ارتباطند و با مراحل پیشرفته‌ی نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی در

جداول درج گردید و بر اساس نوع متغیرها با استفاده از این نرم افزار، آنالیزهای آماری مناسب انجام گرفت. آزمون‌های انجام گرفته شامل آنالیز χ^2 و محاسبه‌ی OR (Odds ratio) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد بودند و مقایسه‌ی تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون t انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه توزیع فراوانی دو پلی مورفیسم SOD1 در ۲۹۰ زن و مرد (۱۴۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو در شهر اهواز به عنوان گروه مورد و ۱۴۵ فرد سالم از جمعیت عمومی به عنوان گروه شاهد) که از لحاظ سن و جنس همسان‌سازی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد زنان و مردان در هر دو گروه به نسبت مساوی، به ترتیب ۷۲ نفر و ۷۳ نفر بودند. میانگین سنی افراد سالم $10/0 \pm 51/3$ سال و افراد بیمار $9/0 \pm 53/9$ سال بود.

(Polymerase chain reaction) برای بررسی پلی مورفیسم rs2234694 و rs2070424 با کمک پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام شد. به منظور تکثیر قطعه‌ی ۲۳۵ بازی، واکنش PCR با دمای اتصال ۵۵/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۳۰ سیکل و دمای اتصال پرایمر ۵۸/۳ درجه‌ی سانتی‌گراد با همان تعداد سیکل برای تکثیر قطعه‌ی ۲۵۸ بازی انجام شد.

به منظور بررسی پلی مورفیسم‌ها، ۱۰ واحد از آنزیم‌های HhaI و MspI به طور جداگانه برای هر محصول PCR مورد استفاده قرار گرفتند. جهت انجام عمل هضم آنزیمی نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند. ویژگی کامل آنزیم‌های برش دهنده در این پژوهش در جدول ۲ آماده است. در نهایت، نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۸ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اطلاعات بیماران و نتایج بررسی‌های مولکولی در نرم‌افزار SPSS وارد شد. سپس نتایج در

جدول ۱. مشخصات کامل پرایمرهای به کار رفته در پژوهش حاضر

نام ژن	نام پلی مورفیسم	توالی نوکلئوتیدی	طول محصول	نام آنزیم	طول قطعه‌ی برش خورده
SOD	(+۳۵ A/C) rs2234694	F:AGGCTGTACCAGTGCAGGTC	۲۳۵	HhaI	۱۳۱
		R:AAAAGCATTCCAGCATTTGG			۱۰۴
SOD	(Intron۳ A/G) rs 2070424	F:TCAGAGGCCTTGGGACATAG	۲۵۸	MspI	۲۲۳
		R:GGGCTGATGCCACTAAACAT			۵۸

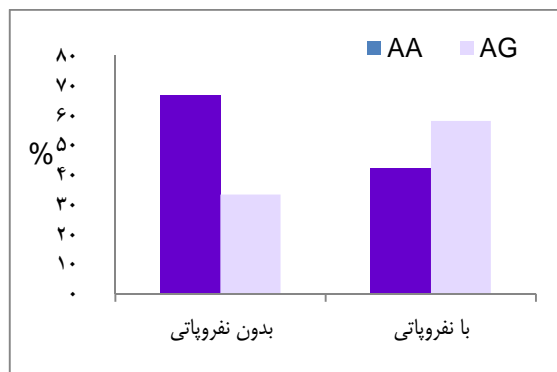
SOD: Superoxide dismutase

جدول ۲. ویژگی‌های آنزیم‌های برش دهنده‌ی به کار رفته جهت برش ناحیه‌ی کنترلی

نام ژن	نام آنزیم	توالی شناسایی	شرایط واکنش (دما-درجه‌ی سانتی‌گراد)
SOD1 (+۳۵ A/C)	HhaI	...GCGC... ...CGCG...	۳۷
SOD1 rs: 2070424	MspI	...CCGG... ...GGCC...	۳۷

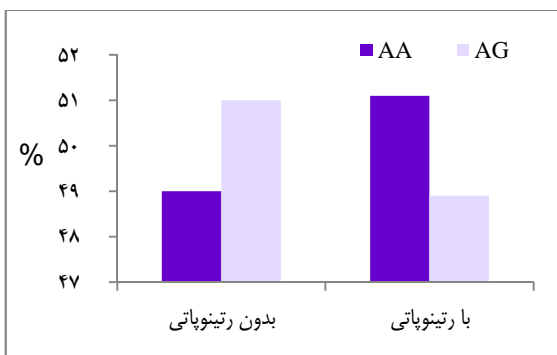
SOD: Superoxide dismutase

ابتلا به نفروپاتی در حضور آلل AG نسبت به ژنوتیپ AA، نسبت شانس خام برابر (۱/۳۲-۵/۷۶) $OR = ۲/۷۶$ ، در فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد است.



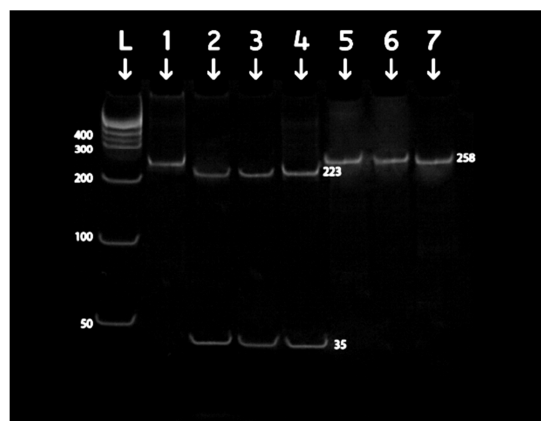
شکل ۲. ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs2070424 در ژن SOD (Superoxide dismutase) با نفروپاتی در گروه مورد

همچنین فراوانی این ژنوتیپ در افراد مبتلا و غیر مبتلا به رتینوپاتی بررسی شد. بر اساس شکل ۳، در گروه مبتلا به رتینوپاتی، فراوانی ژنوتیپ AA برابر ۵۱/۱ و ژنوتیپ AG برابر ۴۸/۹ درصد می‌باشد. در گروه فاقد رتینوپاتی، فراوانی ژنوتیپ‌های AA برابر ۴۹ و AG برابر ۵۱ درصد بود. آنالیز آماری این توزیع ژنوتیپی رابطه‌ی معنی‌داری را نشان نداد ($\chi^2 = ۰/۰۵$ و $P = ۰/۸۱۰$).



شکل ۳. ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs2070424 در ژن SOD (Superoxide dismutase) با رتینوپاتی در گروه مورد

جهت تعیین ژنوتیپ‌های مورد نظر از تکنیک (Restriction fragment length polymorphism) RFLP استفاده شد. جهت تعیین پلی مورفیسم rs2070424، هضم آنزیمی محصولات PCR توسط آنزیم MspI و با مشخص شدن دو ژنوتیپ AA و AG در نمونه‌ها صورت گرفت. الکتروفورز این هضم آنزیمی، با بردن محصولات بر روی ژل ۸ درصد آکریل آمید انجام شد و هتروزیگوت و هموزیگوت بودن افراد مشخص نمایان شد (شکل ۱).



شکل ۱. پلی مورفیسم rs2070424 در ژن SOD

(Superoxide dismutase). ردیف L نشان دهنده‌ی نشانگر

DNA (۵۰ bp). ردیف ۱ محصول

PCR (Polymerase chain reaction) کات نشده ۲۵ bp،

ردیف‌های ۲، ۳ و ۴ محصولات کات شده با طول قطعات ۲۲۳ bp و

۳۵ bp و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AG، ردیف‌های ۵، ۶ و ۷

محصولات کات شده با طول ۲۵۸ bp و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AA

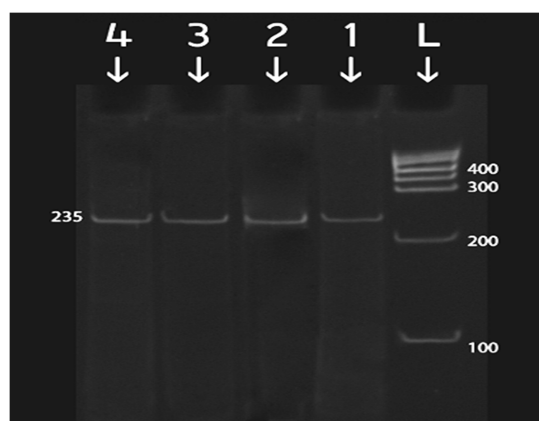
بر اساس شکل ۲، در گروه واجد نفروپاتی، فراوانی ژنوتیپ AA ۴۲ درصد و فراوانی ژنوتیپ AG ۵۸ درصد می‌باشد و در گروه فاقد نفروپاتی، این فراوانی ژنوتیپی به ترتیب ۶۶/۷ و ۳۳/۳ درصد است. توزیع فراوانی ژنوتیپی در این جدول دارای ارتباط معنی‌داری است ($\chi^2 = ۷/۵۵$ و $P = ۰/۰۰۵$). خطر

در جمعیت بالای ۴۰ سال حدود ۲۴ درصد تخمین زده شده است (۲۰). دیابت نوع ۲ یک بیماری چند عاملی است که در آن، مجموعه‌ای از عوامل ژنتیکی و محیطی، عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و حساسیت بافت‌ها به انسولین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هر دوی این عوامل، نقش مهمی در سبب‌شناسی بیماری دارند و این در حالی است که مکانیسم کنترل‌کننده‌ی اثر متقابل این دو عامل هنوز به درستی مشخص نیست. از این رو شناخت مکانیسم کنترل‌کننده‌ی اثر این عوامل می‌تواند منجر به درک بهتر و عمیق‌تر آسیب‌شناسی بیماری گردد (۲۱).

بالا بودن گلوکز خون در دیابت عوارض وخیمی را در بیماران مبتلا به دیابت به دنبال خواهد داشت که از میان آن‌ها، می‌توان به نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی اشاره کرد. نفروپاتی دیابتی (بیماری کلیوی ناشی از دیابت) پدیده‌ای مزمن و پیشرفته است که در نزدیک به ۱/۳ از بیماران مبتلا به دیابت ایجاد می‌شود. نفروپاتی دیابتی با عوارض دیگر دیابت نظیر افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی، افزایش خطر بیماری‌های چشمی دیابت (رتینوپاتی)، افزایش خطر مشکلات عصبی دیابت (نوروپاتی) در ارتباط است (۲۲).

رتینوپاتی دیابتی اغلب هیچ‌گونه نشانه‌ی اولیه ندارد، حتی تورم ماکولار که می‌تواند به سرعت باعث کمی دید شود ممکن است گاهی هیچ علامت هشدار دهنده‌ای در این خصوص نباشد. وقتی عروق خونی شبکه‌ی آسیب می‌بینند، ممکن است باعث نشت مایع یا خون شوند یا منجر به رشد شاخه‌های عروقی شکننده و کلافه‌مانند شوند و باعث تخریب شبکه‌ی شوند و در نتیجه، تصویری که شبکه‌ی به مغز می‌فرستد، تاریک و معوج می‌شود (۲۳).

به منظور بررسی پلی مورفیسم +۳۵A/C در ژن SOD1 محصولات به دست آمده از PCR این پلی مورفیسم، با استفاده از آنزیم HhaI هضم شدند و در آن‌ها فقط ژنوتیپ AA نمایان شد. الکتروفورز این هضم آنزیمی بر روی ژل ۸ درصد پلی آکریل آمید، هموزیگوت بودن تمام افراد را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴. پلی مورفیسم +۳۵A/C در ژن SOD1

ردیف L نشان دهنده‌ی نشانگر (Superoxide dismutase) DNA (۱۰۰ bp)، ردیف ۱ محصول PCR (Polymerase chain reaction) کات نشده‌ی ۲۳۵ bp، ردیف‌های ۲، ۳ و ۴ محصولات کات شده با طول قطعه‌ی ۲۳۵ bp و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AA

از آن جایی که در این نوع پلی مورفیسم، تمام افراد بیمار مورد مطالعه دارای ژنوتیپ AA بودند، بنابراین هیچ‌گونه آزمون آماری برای بررسی ارتباط بین این پلی مورفیسم و نفروپاتی دیابتی و رتینوپاتی دیابتی قابل انجام نبود.

بحث

دیابت نوع ۲ از جمله بیماری‌های متابولیک شایع می‌باشد که در حال حاضر ۱۹۰ میلیون نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا هستند. در ایران شیوع این نوع دیابت

رتینوپاتی دیابتی جزء خطرناک‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های سیستم بینایی انسان به شمار می‌آید و اصلی‌ترین عامل نابینایی در بزرگسالان بین ۲۰-۶۰ سال می‌باشد. طبق آمار منتشر شده، حدود ۲ درصد از افرادی که مدت ۱۵ سال از ابتلای آن‌ها به دیابت گذشته است، به طور کامل فاقد بینایی هستند و حدود ۱۰ درصد از این افراد از اختلالات بینایی رنج می‌برند (۲۴-۲۵).

با توجه به اهمیت و شیوع بالای دیابت و رتینوپاتی ناشی از آن، مطالعات متعددی برای بررسی بروز رتینوپاتی دیابتی و عوامل مؤثر بر آن انجام شده است (۲۸-۲۶، ۱۱). سن، جنس، مدت دیابت، قند خون ناشتا، چربی خون، چاقی و فشار خون از جمله عواملی بودند که در این مطالعات تأثیر آن‌ها در بروز رتینوپاتی دیابتی مورد بررسی قرار گرفته است. رتینوپاتی دیابتی نتیجه‌ی تغییرات مویرگ‌های شبکه‌ای است. هایپرگلیسمی باعث ضخیم شدن دیواره‌ی داخلی رگ‌ها می‌شود که به ناکارایی آن‌ها می‌انجامد. این آسیب‌ها و تغییرات باعث نشت کردن خون از شبکه‌ی و همچنین نفوذ پذیری بیشتر مویرگ‌های خونی شبکه‌ی می‌شود (۲۹).

سوپراکسید یکی از فراوان‌ترین گونه‌های اکسیژن فعال است که می‌تواند به ماکرومولکول‌های سلولی آسیب وارد کند. این ماده در میتوکندری تولید می‌شود و اعتقاد بر این است که می‌تواند در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی درگیر باشد. تحت شرایط طبیعی، زنجیره‌ی انتقال الکترونی میتوکندری، منبع اصلی تولید سوپراکسید است که بیش از ۵ درصد اکسیژن مولکولی را به سوپراکسید تبدیل می‌کند، اما میزان آن در شرایط پاتولوژیک بیشتر می‌شود (۳۰).

ژن‌های مختلفی وجود دارند که محصول پروتئینی آن‌ها قادر به سم‌زدایی سوپراکسید و یا کاهش تولید آن و رادیکال‌های آزاد می‌باشد. آنزیم‌های ضد اکسایشی قسمتی از سیستم آنزیمی بدن هستند که در کاهش فشار اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد دخالت دارند. وظیفه‌ی این آنزیم‌ها جلوگیری از اثر اکساینده‌ها در داخل سلول و ارگانل‌های سلولی نظیر میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها است. محل عمل اکثر این آنزیم‌ها، میتوکندری است. مهم‌ترین این آنزیم‌ها، سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد. سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یک خانواده از آنزیم‌ها هستند که در تبدیل سوپراکسید به H_2O_2 نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند (۹).

با توجه به این که ژن SOD1 کد کننده‌ی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است و عضوی از یک خانواده‌ی آنزیمی درگیر در تبدیل سوپراکسید به H_2O_2 می‌باشد، آنزیم SOD1 یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در نفروپاتی دیابتی است؛ زیرا در این بیماری، میزان این آنزیم در ناحیه‌ی کلیوی کاهش می‌یابد (۱۸). چندین مطالعه به منظور بررسی ارتباط پلی مورفیسم سوپراکسید دیسموتاز با رتینوپاتی و نفروپاتی دیابتی انجام شده است.

در مطالعه‌ی Fujita و همکاران در کشور ژاپن بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، مشخص شد که پلی مورفیسم rs2070427 در ژن SOD1 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در ژاپن، با عامل نفروپاتی ارتباط داشت (۱۸). Panduru و همکاران در کشور رومانی ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم +35A/C این ژن و نفروپاتی دیابتی پیدا نکردند (۳۱).

در مطالعه‌ی دیگر در کشور آمریکا، ارتباط این ژن با بروز رتینوپاتی در موش‌های مدل بررسی شد. در

بررسی اثر دیگر پلی مورفیسم‌های این ژن حایز اهمیت می‌باشد. بررسی پلی مورفیسم‌های ژنتیکی نقش مهمی در شناخت عوامل ژنتیکی درگیر در آسیب‌شناسی دیابت نوع ۲ دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که پلی مورفیسم ژنتیکی rs2070424 در ناحیه‌ی اینترونی ۳ ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱، سطح SOD1 را تحت تأثیر قرار می‌دهد و ارتباط معنی‌داری با نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دارد. بنابراین، این پلی مورفیسم می‌تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای تشخیص افراد مستعد به نفروپاتی دیابتی مد نظر قرار گیرد. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، توصیه می‌شود برای افرادی که در مراحل اولیه‌ی دیابت شناسایی می‌شوند، آزمایش بررسی مولکولی جهت تشخیص این پلی مورفیسم انجام شود تا افراد مستعد ابتلا به نفروپاتی دیابتی مشخص شوند و اقدامات درمانی مناسب برای آن‌ها صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که هزینه‌ی انجام طرح را تقبل نموده است تشکر و قدردانی می‌نمایند.

این پژوهش مشخص شد که موش‌های ترانسژنیک با SOD1 -/- در برابر آسیب ناشی از مواد اکسیداتیو، نسبت به مدل‌های موشی SOD1 +/+ بسیار حساس‌تر و آسیب پذیرتر هستند. نتایج این آزمایش نشان داد که SOD1، سلول‌های شبکه‌ی چشم را در برابر آسیب‌های ناشی از مواد اکسیداتیو محافظت می‌کند. بنابراین می‌تواند کاندید مناسبی برای ژن درمانی به منظور پیشگیری از تخریب شبکه‌ی سلولی در نظر گرفته شود (۳۲).

نتایج به دست آمده در این پژوهش، گویای این است که تمام افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ دارای نفروپاتی و رتینوپاتی در این مطالعه، حاملین ژنوتیپ AA در پلی مورفیسم ۳۵A/C+ می‌باشند و در آن‌ها سطح ابتلا به نفروپاتی و رتینوپاتی بسیار کم است. در پلی مورفیسم rs2070427، ژنوتیپ AG با نفروپاتی ارتباط معنی‌داری دارد و افراد دارای این ژنوتیپ، ۲/۷۶ برابر بیشتر احتمال ابتلا به نفروپاتی را دارند (شکل ۲)؛ در حالی که هیچ‌گونه ارتباطی بین این پلی مورفیسم با رتینوپاتی مشاهده نشد.

تعداد مطالعات گزارش شده در ارتباط با تأثیر این پلی مورفیسم بر خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ بسیار محدود می‌باشد و با در نظر گرفتن تفاوت مختلف جغرافیایی، لزوم مطالعات بیشتر در این زمینه و

References

1. Qiao Q, Hu G, Tuomilehto J, Nakagami T, Balkau B, Borch-Johnsen K, et al. Age- and sex-specific prevalence of diabetes and impaired glucose regulation in 11 Asian cohorts. *Diabetes Care* 2003; 26(6): 1770-80.
2. Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med* 2001; 345(18): 1345-6.
3. Bloomgarden ZT. Insulin resistance: causes and consequences. *Int Rev Neurobiol* 2005; 65: 1-24.
4. Hegele RA, Pollex RL. Genetic and physiological insights into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289(3): R663-R669.
5. Beaglehole R, Bonita R. Reinvigorating public health. *Lancet* 2000; 356(9232): 787-8.
6. Ostbye T, Welby TJ, Prior IA, Salmond CE,

- Stokes YM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, migration and westernisation: the Tokelau Island Migrant Study. *Diabetologia* 1989; 32(8): 585-90.
7. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6): 1615-25.
 8. The World Health Report 1997--conquering suffering, enriching humanity. *World Health Forum* 1997; 18(3-4): 248-60.
 9. Camacho P, Pitale S, Abaira C. Beneficial and detrimental effects of intensive glycaemic control, with emphasis on type 2 diabetes mellitus. *Drugs Aging* 2000; 17(6): 463-76.
 10. Parving HH, Andersen S, Jacobsen P, Christensen PK, Rossing K, Hovind P, et al. Angiotensin receptor blockers in diabetic nephropathy: renal and cardiovascular end points. *Semin Nephrol* 2004; 24(2): 147-57.
 11. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998; 105(10): 1801-15.
 12. Hallman DM, Huber JC, Jr., Gonzalez VH, Klein BE, Klein R, Hanis CL. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care* 2005; 28(5): 1163-8.
 13. Taverna MJ. Genetics of diabetic complications: retinopathy. *Ann Endocrinol (Paris)* 2004; 65(1 Suppl): S17-S25.
 14. Amano S, Yamagishi S, Koda Y, Tsuneoka M, Soejima M, Okamoto T, et al. Polymorphisms of sorbitol dehydrogenase (SDH) gene and susceptibility to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses* 2003; 60(4): 550-1.
 15. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, et al. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Database issue): D237-D240.
 16. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404(6779): 787-90.
 17. DeRubertis FR, Craven PA, Melhem MF. Acceleration of diabetic renal injury in the superoxide dismutase knockout mouse: effects of tempol. *Metabolism* 2007; 56(9): 1256-64.
 18. Fujita H, Fujishima H, Chida S, Takahashi K, Qi Z, Kanetsuna Y, et al. Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(6): 1303-13.
 19. Mollsten A, Marklund SL, Wessman M, Svensson M, Forsblom C, Parkkonen M, et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2007; 56(1): 265-9.
 20. Azimi-Nezhad M, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh MR, Safarian M, Esmaeili H, Parizadeh SM, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Iran and its relationship with gender, urbanisation, education, marital status and occupation. *Singapore Med J* 2008; 49(7): 571-6.
 21. Goldstein BJ. Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4(Suppl 6): S3-10.
 22. Klein BE, Klein R, Moss SE. Prevalence of cataracts in a population-based study of persons with diabetes mellitus. *Ophthalmology* 1985; 92(9): 1191-6.
 23. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102(4): 527-32.
 24. Lee SC, Lee ET, Kingsley RM, Wang Y, Russell D, Klein R, et al. Comparison of diagnosis of early retinal lesions of diabetic retinopathy between a computer system and human experts. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(4): 509-15.
 25. Massin P, Allouch C, Haouchine B, Metge F, Paques M, Tanguy L, et al. Optical coherence tomography of idiopathic macular epiretinal membranes before and after surgery. *Am J Ophthalmol* 2000; 130(6): 732-9.
 26. Looker HC, Krakoff J, Knowler WC, Bennett PH, Klein R, Hanson RL. Longitudinal studies of incidence and progression of diabetic retinopathy assessed by retinal photography in pima indians. *Diabetes Care* 2003; 26(2): 320-6.
 27. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112(9): 1217-28.
 28. Liu QZ, Pettitt DJ, Hanson RL, Charles MA, Klein R, Bennett PH, et al. Glycated haemoglobin, plasma glucose and diabetic retinopathy: cross-sectional and prospective analyses. *Diabetologia* 1993; 36(5): 428-32.
 29. Gerald P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med* 2009; 15(11): 1303-13.

- 1298-306.
30. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(4): 139-42.
31. Panduru NM, Cimponeriu D, Cruce M, Ion DA, Mota E, Mota M, et al. Association of +35A/C (intron3/exon3) polymorphism in SOD1-gene with diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51(1): 37-41.
32. Dong A, Shen J, Krause M, Akiyama H, Hackett SF, Lai H, et al. Superoxide dismutase 1 protects retinal cells from oxidative damage. *J Cell Physiol* 2006; 208(3): 516-26.

Genetic Polymorphisms of Superoxide Dismutase 1 and Its Relationship to Diabetic Neuropathy and Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Ahvaz, Iran

Javad Mohammadi-Asl PhD¹, Arghavan Soleimanizadeh MSc²,
Hajieh Bibi Shahbazian PhD³, Heshmatollah Shahbazian PhD⁴, Neda Golchin MSc⁵

Original Article

Abstract

Background: Diabetes is the most prevalent non-infectious disorder of endocrine glands with an increasing rate of incidence. Several people with this type of disease suffer from diabetic retinopathy and nephropathy. Oxidative stress is involved in the path physiology of diabetic nephropathy and retinopathy. The superoxide dismutase (SOD) enzymes play a major role in detoxification of reactive oxygen species and have a protective effect against diabetic nephropathy and retinopathy. Several studies claimed that the polymorphisms of this gene have a key-role in tissue damage results from diabetes.

Methods: In the present study, two SNPs in SOD1 gene were analyzed in 145 patients with type 2 diabetes mellitus in Ahvaz, Iran. Blood samples of the patients and 145 individuals without diabetes as controls were collected. DNA was extracted and the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP) was performed.

Findings: For the rs2070424 polymorphism, there were significant differences between the patients who suffer from nephropathy and the control group ($P = 0.005$; $\chi^2 = 7.55$); but no significant difference in the rate of this gene polymorphism between the patients with retinopathy and the control group was seen. The analysis of rs2234694 polymorphism showed that all individuals with and without diabetes had AA genotype. Therefore, it was impossible to perform any statistical test to determine the relationship of this polymorphism and diabetic nephropathy or retinopathy.

Conclusion: Understanding the role of polymorphisms of SOD1 gene to modify the course of retinopathy could be an important target for future pharmacological interventions.

Keywords: Diabetes mellitus, SOD1 gene, Polymorphism, Genetic, Case-Control study

Citation: Mohammadi-Asl J, Soleimanizadeh A, Shahbazian HB, Shahbazian H, Neda Golchin. Genetic Polymorphisms of Superoxide Dismutase 1 and Its Relationship to Diabetic Neuropathy and Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Ahvaz, Iran. J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 442-52

1- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2- Department of Genetics, Noor Genetics Lab, Ahvaz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

4- Assistant Professor, Department of Urology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

5- Department of Biochemistry, Noor Genetics Lab, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Javad Mohammadi-Asl PhD, Email: mohammadi-asl@ajums.ac.ir

اثر داروی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌ی کموکاینی CXCR^۳ مربوط به لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱

محدثه طغیانی خوراسگانی^۱، دکتر ناهید اسکندری^۲، دکتر مرجان قراگوزلو^۳، دکتر محمد فضیلتی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سیلیمارین یک کمپلکس فلاونولیگنان مشتق از گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی SilybumMarianum است که به خاطر اثرات حفاظت کبدی و ضد التهابی‌اش معروف است. در سال‌های اخیر، توجه محققان به اثرات تعدیل ایمنی (Immunomodulatory) این گیاه معطوف شده است و در این خصوص، مطالعاتی انجام گردیده است. در مطالعه‌ی حاضر، اثر داروی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌ی کموکاینی CXCR^۳ (Chemokine (C-X-C motif) receptor^۳) لنفوسیت Th^۱ (T helper^۱) در مقایسه با دی متیل سولفوکساید (DMSO) یا (Dimethyl sulfoxide) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: ابتدا از افراد سالم خون‌گیری انجام شد (n = ۸). سپس با استفاده از فایکول سلول‌های تک هسته‌ای، خون محیطی (PBMC) یا (Peripheral blood mononuclear cell) جداسازی گردید و در محیط RPMI (Roswell Park memorial institute medium) و در مجاورت سیلی مارین و DMSO با غلظت مناسب (۱۰۰ Mμ) قرار گرفت. درصد سلول‌های CD^۴ T بیان‌کننده‌ی گیرنده‌ی کموکاینی در بین جمعیت‌های لنفوسیت‌های T توسط رنگ‌های FITC (Fluoresceinisothiocyanate) و PE (Phycoerythrin) که روی آنتی بادی‌های منوکلونال ضد انسانی کونژوگه شد، با استفاده از فلوسایتومتری نسبت به شاهد منفی (DMSO) تعیین گردید.

یافته‌ها: سیلی مارین در غلظت مورد استفاده (۱۰۰ Mμ) در مقایسه با DMSO به طور قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش بیان گیرنده‌ی CXCR^۳ گردید (P < ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: ارزیابی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌های کموکاینی، به عنوان یک عامل تعدیل‌کننده‌ی ایمنی (Modifier) نشان داد که در شرایطی که سرکوب ایمنی (Immunosuppression) مورد نیاز است، می‌تواند داروی ارزشمندی باشد.

واژگان کلیدی: لنفوسیت‌های T helper^۱، گیرنده‌ی کموکاینی، سیلی مارین، فلوسیتومتری

ارجاع: طغیانی خوراسگانی محدثه، اسکندری ناهید، قراگوزلو مرجان، فضیلتی محمد. اثر داروی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌ی کموکاینی

CXCR^۳ مربوط به لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۶۰-۴۵۳

مقدمه

سرکوب‌کننده‌ی سیستم ایمنی و ضد التهاب کنونی که دارای اثرات نامطلوب هستند، به کار می‌رود. از جمله‌ی این داروها، فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات طبیعی هستند که در اغلب گیاهان یافت

امروزه تحقیقات زیادی به منظور یافتن داروهای جایگزین در حال انجام است که این داروهای مکمل با اثرات جانبی کمتر، برای جاگزینی داروهای

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر ناهید اسکندری

بعضی از مقالات با بررسی اثر مهار سیلی مارین بر تکثیر سلول‌های T در شرایط آزمایشگاهی، نشان داده‌اند که با مهار سایتوکاین‌های IFN- γ (Interferon gamma) و IL-2 (Interleukin 2) همراه بوده است (۵). در مقابل، عده‌ای دیگر اثر تحریکی آن را به شیوه‌ی وابسته به دوز (Dose-dependent) بر تکثیر لنفوسیت‌ها نشان داده‌اند (۷).

در یک مطالعه که بر روی بیماران مبتلا به سیروز الکلی انجام شده است، اثر تحریکی سیلی مارین بر پاسخ لنفوسیت‌های خون محیطی به میتوزن‌ها به دنبال تجویز خوراکی Legalon (سیلی مارین) گزارش شده است (۸).

پس ممکن است ارزیابی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌های کموکاینی که نوعی سایتوکاین هستند، نه تنها برای توصیف مکانیسم تعدیل ایمنی این دارو، بلکه برای ایجاد یک کلاس جدید از عوامل سرکوب کننده‌ی ایمنی ارزشمند باشد. از سوی دیگر، در صورت اثبات عدم سمی بودن برای لنفوسیت‌های T انسانی، به عنوان یک داروی جایگزین برای داروهای سرکوبگر ایمنی بدون عوارض جانبی جدی در کلینیک قابل استفاده خواهد بود.

اکثر مطالعاتی که به بررسی اثر سیلی مارین بر لنفوسیت‌های T پرداخته‌اند، بر روی لاین سلول‌های سرطانی (Cell line) یا لنفوسیت‌های T موشی بوده است (۹، ۴). در مواردی هم که از سلول انسانی استفاده شده است، تحریک و فعال‌سازی بیشتر از طریق میتوزن صورت گرفته است (۹، ۴). این مطالعه با استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononucleated cell) از

می‌شوند. این ترکیبات پلی فنولیک، طیف قابل توجهی از فعالیت‌های بیوشیمیایی اثرگذار بر اعمال پایه‌ای سلول نظیر تکثیر، تمایز و آپوپتوز را نشان می‌دهند. در میان فلاونوئیدها، سیلی مارین یک کمپلکس فلاونوگلیکان مشتق از گیاه خار مریم (Milk thistle) با نام علمی Silybummarianum است که ترکیبی از Silybin، Silychristin و Silydianin می‌باشد. سیلی مارین به خاطر اثرات حافظت کبدی و ضد التهابی‌اش معروف است. از این ترکیب در درمان بیماری‌های مختلف کبدی نظیر مسمومیت‌های الکلی یا دارویی، مسمومیت‌های قارچی و هپاتیت‌های ویروسی در کلینیک استفاده می‌شود. مطالعات فارموکولوژیکی نشان داده‌اند که سیلی مارین حتی در دوزهای بالا، برای بیماران مبتلا به سیروز کبدی سمی نمی‌باشد (۳-۱).

مطالعات وسیع طی دهه‌ی اخیر نشان داده‌اند که سیلی مارین می‌تواند تکثیر انواعی از سلول‌های توموری (نظیر سلول‌های توموری مربوط به پروستات، سینه، تخمدان، کولون، ریه و مثانه) را مهار کند. علاوه بر خواص حفاظت کبدی و ضد التهابی، سیلی مارین دارای اثرات ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی نیز می‌باشد. این مطالعات پیشنهاد می‌کنند که مواجهه با سیلی مارین موجب ایجاد وقفه در پیشروی سیکل سلولی می‌شود (۴).

در سال‌های اخیر، توجه محققان به اثرات تعدیل ایمنی (Immunomodulatory) این گیاه معطوف شده است و در این خصوص، مطالعات متعددی انجام گردیده است (۶-۵، ۳-۱). با این حال، اثر سیلی مارین بر سلول‌های ایمنی از جمله لنفوسیت‌های T و نیز مکانیسم‌های مربوط تا حد زیادی ناشناخته است.

شدند و Viability آن‌ها با روش علامت‌گذاری تریپان بلو (۰/۴ درصد در PBS) مشخص گردید. لنفوسیت‌های دارای Viability بیش از ۹۵ درصد در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی سلول‌ها و شرایط کشت

PBMCs جدا شده با غلظت 8×10^5 سلول در میلی‌لیتر در پلیت ۲۴ خانه‌ی مسطح در حجم ۱ میلی‌لیتر با 1 g/ml از Con A جهت تحریک میتوز و در مجاورت $100 \text{ M}\mu$ سیلی مارین و یا در حلال آن DMSO (به عنوان شاهد منفی) در محیط کشت (که میزان آن از کسر مقدار سلول استفاده شده بر حسب میکرولیتر از ۹۰۰ محاسبه گردید)، قرار داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استاندارد (دمای 37°C ، رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵ درصد) کشت داده شدند. در پایان این دوره‌ی انکوباسیون، سلول‌ها برداشت شدند و برای ارزیابی تغییرات احتمالی در بیان کموکاین گیرنده‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری

درصد سلول‌های $\text{CD}4^+ \text{T}$ بیان‌کننده‌ی گیرنده‌ی کموکاین CXCR3 در بین جمعیت‌های لنفوسیت‌های T، توسط دستگاه FACSCalibur flow cytometer با کامپیوتری که به نرم‌افزار Cell Quest مجهز بود، مشخص گردید و این کار به کمک رنگ‌های FITC (Fluorescein isothiocyanate) و PE (Phycoerythrin) که روی آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد انسانی کونژوگه شد، انجام گردید. برای تعیین $\text{CD}4$ و CXCR3 به ترتیب از FITC و PE استفاده شد. 5×10^5 PBMCs با 10 میکرولیتر از هر جفت آنتی‌بادی‌ها نشاندار گردید. بعد از انکوباسیون به

داوطلبین سالم، کشت در محیط RPMI (Roswell Park memorial institute medium) و در مجاورت سیلی مارین صورت گرفت. هدف از این مطالعه، بررسی اثر داروی سیلی مارین و دی متیل سولفوکساید بر بیان گیرنده‌ی کموکاینی CXCR3 (Chemokine (C-X-C motif) receptor³) مربوط به لنفوسیت‌های کمکی نوع ۱ ($\text{Th}1$ یا $\text{T helper}1$) بود.

روش‌ها

آماده‌سازی سیلی مارین

ابتدا 0.05 گرم از پودر سیلیمارین (sigma, mw: 7 g) در 1 ml دی متیل سولفوکساید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) خالص به منظور ایجاد محلول ذخیره 100 mM (Stock solution) حل شد. محلول ذخیره در ویال‌های کوچک تقسیم شد و در 20°C تا موقع استفاده نگهداری شد. برای تهیه‌ی محلول کار 1 mM ، از سیلیمارین 100 mM ، $10 \mu\text{l}$ از سیلیمارین 100 mM قطره قطره در $90 \mu\text{l}$ از دی متیل سولفوکساید 100 درصد حل شد. سپس با $900 \mu\text{l}$ از محیط RPMI ۱۶۴۰ به حجم 1 mM رسید.

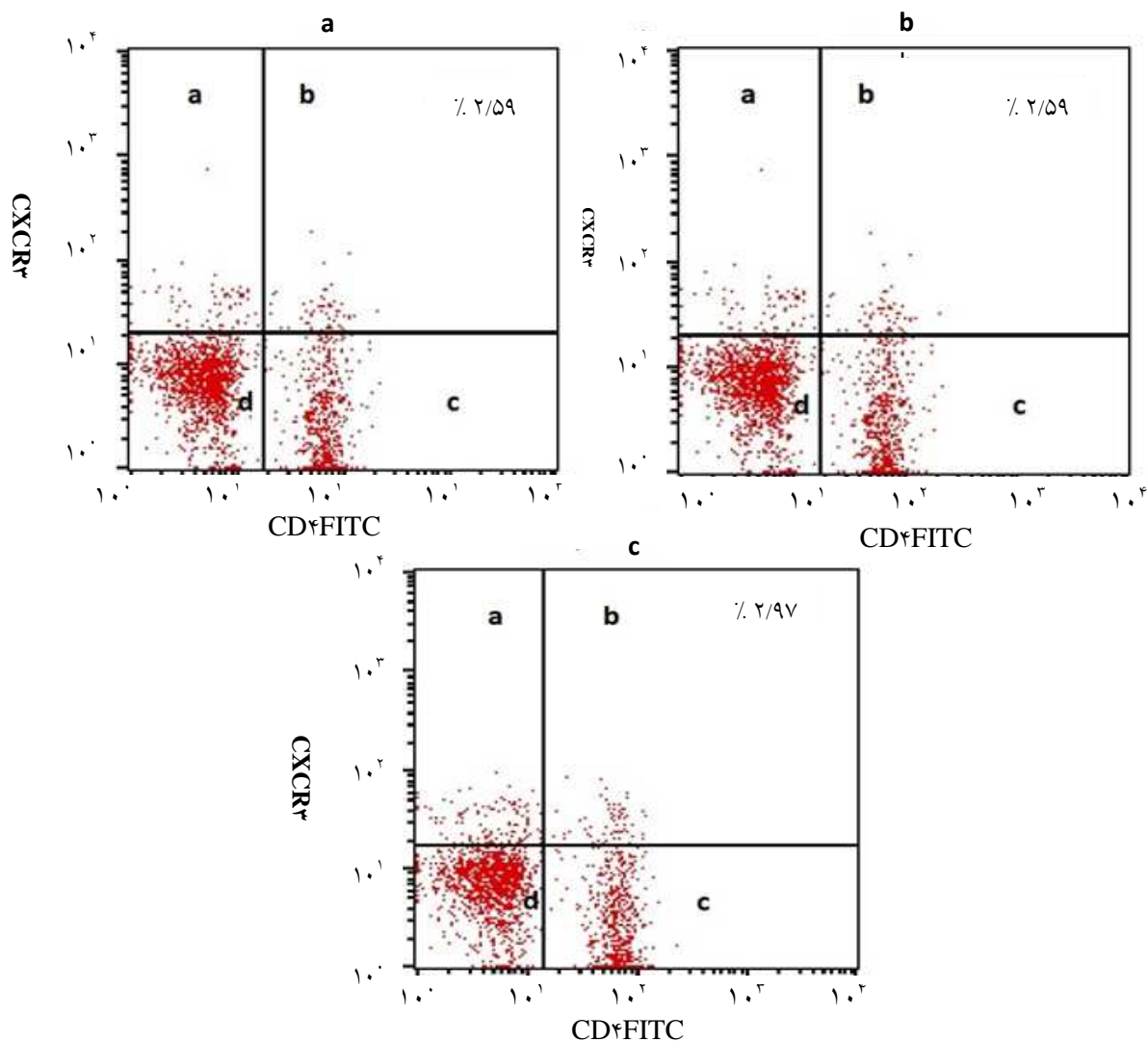
جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های تک هسته‌ای

خون محیطی (PBMCs)

نمونه‌ی خون از افراد داوطلب سالم ($n = 8$) 5 ml از خون هپارینه با حجم مساوی از فسفات بافر سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) مخلوط شد. مخلوط حاصل با دقت بر روی 5 ml فایکول برده شد. پس از سانتریفوژ (2800 rpm ، 20 دقیقه در دمای اتاق) لایه‌ی حد فاصل پلاسما و فایکول که همان PBMCs است، با پیپت پاستور جمع‌آوری شد. سپس دو مرتبه با PBS شستشو داده شد. سلول‌ها شمارش

معمول، ۱۰۰۰۰ سلول در هر لوله شمرده شد. ایزوتایپ IgG (Immunoglobulin G) جهت کنترل پس زمینه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به عنوان درصد کلی سلول‌های $CD4^+$ T بیان کننده‌ی گیرنده‌های کموکاینی در بین جمعیت‌های لنفوسیت‌های T بیان شد (شکل ۱).

مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی، سلول‌ها دو بار (۱۰ دقیقه، ۱۵۰۰ rpm) با PBS شسته و سپس در ۰/۵ ml از PBS غوطه‌ور شدند. خلوص لنفوسیت‌ها توسط پارامترهای معمول Forward scatter/ Side scatter به وسیله‌ی جمعیت لنفوسیت‌های $CD45$ تجزیه و تحلیل گردید. به طور



شکل ۱. تصاویر فلوسایتومتری نشان دهنده‌ی بیان $CXCR3$ لنفوسیت‌های $CD4^+$ T در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی شکل‌ها به ترتیب a, b و c قبل از کشت و بعد از کشت با سیلی مارین و DMSO. هر تصویر به چهار قسمت تقسیم شده و هر قسمت نشان دهنده‌ی سلول‌هایی است که به وسیله‌ی رنگ فلورسنت مرتبط از یکدیگر جدا شده‌اند. a: سلول‌های $CXCR3$ مثبت، b: سلول‌های $CD4$ و $CXCR3$ مثبت، c: سلول‌های $CD4$ مثبت، d: سلول‌های شاهد منفی

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

متغیر گیرنده‌های کموکاینی در سلول‌های Th1 با سیلی مارین یا DMSO (شاهد منفی) مجاور شد و از آزمایش Non parametric جفت نمونه‌های Wilcoxon جهت مقایسه‌ی داده‌های گروه‌بندی شده استفاده گردید. اطلاعات جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز گردید. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار در جداول گزارش شدند. $P \leq 0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

تفاوت معنی‌دار وجود داشت (مقدار Z نمره‌ی معیاری است که دارای توزیعی با میانگین صفر و انحراف معیار واحد یک می‌باشد) (جدول ۱).
از طرف دیگر، مقدار میانگین در مجاورت سیلی مارین در حدود ۲/۳۸ درصد افزایش یافت. همچنین مقدار Z به دست آمده برای نمونه‌ی سیلی مارین با DMSO برابر ۰/۵۲۱- می‌باشد که از $(P < 0/05)$ بزرگ‌تر بود. از این رو بین نمونه‌ی سیلی مارین با نمونه‌ی DMSO تفاوت معنی‌دار وجود داشت. همچنین میانگین نمونه در مجاورت سیلی مارین (۸/۴۴ درصد) بیشتر از میانگین نمونه در مجاورت DMSO (۶/۱۷ درصد) بود.

یافته‌ها

درصد سلول‌های $CD4^+ T$ بیان‌کننده‌ی گیرنده‌ی CXCR3 در بین جمعیت‌های لنفوسیت‌های T قبل از کشت ۵/۱۶ درصد، در مجاورت DMSO با سیلی مارین ۶/۱۷ درصد و ۷۲ ساعت بعد از کشت در مجاورت سیلی مارین حدود ۸/۴۴ درصد تعیین گردید. برای تعیین $CD4$ ، آنتی‌بادی متصل شده به ماده‌ی فلورسنت FITC و برای تعیین CXCR3، آنتی‌بادی متصل شده به ماده‌ی فلورسنت PE، استفاده شد. یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که مقدار Z به دست آمده برای نمونه‌ی سیلی مارین با قبل از کشت برابر ۲/۳۸- می‌باشد $(P < 0/05)$. از این رو، بین نمونه‌ی سیلی مارین با نمونه‌ی قبل از کشت،

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که سیلی مارین باعث افزایش بیان گیرنده‌ی CXCR3 می‌شود. مشابه این نتایج، در تحقیقی توسط Rabinovich و همکاران (۱۰) اثر Anti- $CD3$ بر روی بیان گیرنده‌ی CXCR3 بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان دهنده‌ی افزایش بیان این گیرنده بود. Sallusto و همکاران (۱۱) فقدان کامل یا کاهش mRNA CXCR3 را بعد از تأثیر anti- $CD3$ گزارش کردند. این تناقض می‌تواند به علت تفاوت در آنتی‌بادی مورد استفاده باشد.

جدول ۱. مقایسه‌ی مقدار Z و سطح معنی‌داری سیلی مارین با قبل از کشت و DMSO با سیلی مارین

TH1- CXCR3		
مقدار P	مقدار Z	متغیرها
۰/۰۱۷	-۲/۳۸۰	سیلی مارین با قبل از کشت
۰/۰۱۲	-۲/۵۲۱	DMSO با سیلی مارین

مقدار Z: نمره‌ی معیاری است که دارای توزیعی با میانگین صفر و انحراف معیار واحد یک می‌باشد.

DMSO: Dimethyl sulfoxide

اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی سیلی مارین در مقالات متعدد نشان داده شده است (۹، ۴). در رابطه با اثر سیلی مارین به عنوان داروی سرکوبگر سیستم ایمنی در بیماری‌های خود ایمنی مدارک علمی کافی وجود ندارد، بعضی از مطالعات اثر مهار سیلی مارین را بر تکثیر لنفوسیت‌های T در شرایط Ex vivo و In vitro نشان داده‌اند که با مهار تولید IL-2 و IFN- γ همراه می‌باشد (۸-۷، ۳). از این رو با توجه به اثر مهار سیلی مارین بر روی تولید سایتوکاین‌ها، این احتمال وجود دارد که این دارو بر روی بیان گیرنده‌های کموکاینی - که خانواده‌ی بزرگی از سایتوکاین‌ها هستند - نیز تأثیرگذار باشد.

ارزیابی سیلی مارین بر بیان گیرنده‌ی کموکاینی CXCR3، نه تنها برای توصیف مکانیسم تعدیل ایمنی این دارو بلکه برای ایجاد یک کلاس جدید از عوامل سرکوب کننده، می‌تواند ارزشمند باشد. از سوی دیگر، در صورت اثبات عدم سمی بودن برای لنفوسیت‌های T انسانی، به عنوان یک داروی جایگزین برای داروهای سرکوبگر ایمنی بدون عوارض جانبی جدی در کلینیک قابل استفاده خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی افراد داوطلب اهدا کننده‌ی خون که در اجرای این تحقیق یاری نمودند، تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

Qin و همکاران (۱۲) گزارش دادند که CXCR3 بعد از یک دوره‌ی کشت طولانی با IL-2 افزایش می‌یابد. از آن جایی که لیگاندهای مرتبط با گیرنده‌ی CXCR3 توسط IFN γ و سایتوکاین‌های التهابی القا می‌شوند (۱۴-۱۳)، این امر منجر به تولید سلول‌های نوع Th1 و یک پاسخ متأثر از این سلول‌ها می‌شود. به دلایل متعددی، سیستم ایمنی این توانایی را دارد که علیه آنتی ژن‌های خودی نیز وارد عمل شود و سبب آسیب و عوارض جانبی شود که در نهایت، باعث بروز بیماری (بیماری‌های خود ایمنی) در افراد می‌گردد.

در این راستا، تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی انسان توسط ایمنی هومورال و سلولی مورد توجه قرار گرفته است. در بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های خود ایمن، سرطان و ... سرکوب سیستم ایمنی بدن یکی از راه‌های کنترل این گروه از بیماری‌ها می‌باشد که باعث کاهش و یا مهار پاسخ‌های ایمنی شود. به طور معمول، روش‌های متعددی برای سرکوب سیستم ایمنی به کار می‌رود. داروهای سرکوبگر ایمنی (مانند کورتون‌ها، راپامایسین و ...) که لنفوسیت‌های T را مهار یا نابود می‌کنند، یک روش مورد استفاده می‌باشد. مصرف این داروها در دراز مدت در بسیاری از بیماری‌ها همانند لوپوس، آرتریت روماتوئید و ... دارای عوارض جانبی زیادی است. به همین دلیل، در سال‌های اخیر توجه محققان به داروهای تعدیل کننده‌ی سیستم ایمنی با اثرات جانبی کمتر مانند سیلی مارین معطوف شده است (۱۵، ۷).

References

1. Li D, Wang Z, Sun P, Jin Y, Lin DH, Hebert SC, et al. Inhibition of MAPK stimulates the Ca²⁺-dependent big-conductance K channels in cortical collecting duct. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(51): 19569-74.
2. Gazak R, Walterova D, Kren V. Silybin and

- silymarin--new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* 2007; 14(3): 315-38.
3. Gharagozloo M, Amirghofran Z. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(8): 525-32.
 4. Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res* 2006; 26(6B): 4457-98.
 5. Gharagozloo M, Velardi E, Bruscoli S, Agostini M, Di SM, Donato V, et al. Silymarin suppress CD4+ T cell activation and proliferation: effects on NF-kappaB activity and IL-2 production. *Pharmacol Res* 2010; 61(5): 405-9.
 6. Hussain SA, Jassim NA, Numan IT, Al-Khalifa II, Abdullah TA. Anti-inflammatory activity of silymarin in patients with knee osteoarthritis. A comparative study with piroxicam and meloxicam. *Saudi Med J* 2009; 30(1): 98-103.
 7. Wilasrusmee C, Kittur S, Shah G, Siddiqui J, Bruch D, Wilasrusmee S, et al. Immunostimulatory effect of Silybum Marianum (milk thistle) extract. *Med Sci Monit* 2002; 8(11): BR439-BR443.
 8. Lang I, Nekam K, Deak G, Muzes G, Gonzales-Cabello R, Gergely P, et al. Immunomodulatory and hepatoprotective effects of in vivo treatment with free radical scavengers. *Ital J Gastroenterol* 1990; 22(5): 283-7.
 9. Cheung CW, Gibbons N, Johnson DW, Nicol DL. Silibinin--a promising new treatment for cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10(3): 186-95.
 10. Rabinovich GA, Ariel A, Hershkoviz R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 1999; 97(1): 100-6.
 11. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, et al. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* 1999; 29(6): 2037-45.
 12. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998; 101(4): 746-54.
 13. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997; 61(3): 246-57.
 14. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187(12): 2009-21.
 15. Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Paschal DM, Apodaca MC, Liu Y, et al. Silymarin inhibits in vitro T-cell proliferation and cytokine production in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 138(2): 671-81, 681.

The Effect of Silymarin on the Expression of Chemokine Receptors in T Helper 1 (Th1) Cells

Mohaddese Toghiani-Khorasgani¹, Nahid Eskandari MD, PhD²,
Marjan Gharagozloo PhD², Mohammad Fazilati PhD³

Original Article

Abstract

Background: Silymarin, apolyphenolic flavonoid derived from milk thistle (*Silybum marianum*), is known to have anti-inflammatory, hepatoprotective, and anticarcinogenic effects. The aim of this study was to investigate the effect of silymarin on the chemokine receptor of (T helper) Th1 cells.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 8 healthy individuals were activated with Concanavalin 'A' and treated with silymarin (100 μ M) or dimethyl sulfoxide (DMSO), as negative control, in a standard condition (RT: 37 and CO₂: 5%). Cells were incubated (72 hours) and then examined for the cytometric evaluation of chemokine receptor CXCR3 expression on Th1 cells. Peripheral blood lymphocyte subpopulations were identified and evaluated by two color flow cytometric analysis. A nonparametric paired samples Wilcoxon test was applied to compare the grouped data. Results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). P-values < 0.05 were considered to indicate significant differences.

Findings: PBMCs treated with silymarin increased the expression of CXCR3 on Th1 cells. These results were significantly (P = 0.017) in all samples.

Conclusion: This study provided evidences of effectiveness for silymarine on the expression of CXCR3. Therefore, in future, silymarine could be used instead of other drugs such as immunosuppressive with fewer side effects in autoimmune diseases.

Keywords: Silymarine, Chemokine receptor, T helper cells, Flow cytometry

Citation: Toghiani-Khorasgani M, Eskandari N, Gharagozloo M, Fazilati M. **The Effect of Silymarin on the Expression of Chemokine Receptors in T Helper 1 (Th1) Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 453-60

1- Department of Biology, Payam-e-Noor University, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Biology, Payam-e-Noor University, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Nahid Eskandari MD, PhD, Email: neskandari@med.mui.ac.ir

بررسی ۵ ساله‌ی شاخص‌های برنامه‌ی ریشه‌کنی فلج شل حاد در استان اصفهان و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های استاندارد جهانی

اسماعیل اختر^۱، دکتر رضا فدایی نوبری^۲

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: شرط لازم جهت رسیدن به هدف ریشه‌کنی بیماری پولیومیلیت، ارزیابی و پایش روش ریشه‌کنی پولیومیلیت با اجرای نظام مراقبت (Surveillance) از این بیماری می‌باشد. این مطالعه با هدف تعیین وضعیت شاخص‌های ریشه‌کنی فلج شل حاد در اصفهان و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های استاندارد جهانی طرح‌ریزی شد.

روش‌ها: در این مطالعه که یک بررسی به روش توصیفی مقطعی بدون جهت است، کلیه‌ی موارد فلج شل حاد گزارش شده در استان اصفهان از سال ۸۶-۱۳۸۲، که به مرکز بهداشت شهرستان و استان گزارش شده بودند، به روش سرشماری مورد مطالعه قرار گرفتند. اطلاعات پس از مرور پرونده‌های بیماران استخراج و طبقه‌بندی شد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: تعداد ۱۱۵ مورد بیمار با فلج شل حاد گزارش شد که از این میان، ۴۱ درصد زن و ۵۹ درصد مرد بودند. میانگین سنی مراجعین $3/83 \pm 5/71$ سال، با دامنه‌ی سنی ۱-۱۵ سال بود. میانگین بروز فلج شل حاد $1/74$ محاسبه شد که کمتر از میزان مورد انتظار (۲) است. از بین شاخص‌های کشوری، کشف موارد (۸۰ درصد در عرض ۷ روز >)، شاخص بررسی و معاینه‌ی موارد (۸۰ درصد در عرض ۴۸ ساعت)، شاخص به هنگام بودن نمونه‌گیری (۸۰ درصد در طی ۱۴ روز >)، شاخص ارسال به هنگام نمونه‌ها به آزمایشگاه (۸۰ درصد در طی ۳ روز >)، شاخص پیگیری روز ۶۰ (۹۰ درصد >)، شاخص طبقه‌بندی موارد (۱۰۰ درصد در طی ۷۰ روز)، دو شاخص بررسی موارد و پیگیری روز ۶۰ کمتر از سطح مورد انتظار با استاندارد جهانی بود.

نتیجه‌گیری: طبق مطالعه‌ی حاضر، نظام مراقبت در اصفهان جهت تشخیص موارد دچار فلج شل حاد دقیق عمل می‌کند، اما همچنان جهت ریشه‌کنی این بیماری نیاز به ارزیابی بیشتر و بهبود کیفیت نظام مراقبت وجود دارد. بنابراین، ادامه‌ی واکسیناسیون گسترده علیه ویروس فلج اطفال و پیگیری بیماران مبتلا به این بیماری توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: فلج شل حاد، نظام مراقبت ریشه‌کنی، ایران

ارجاع: اختر اسماعیل، فدایی نوبری رضا. بررسی ۵ ساله‌ی شاخص‌های برنامه‌ی ریشه‌کنی فلج شل حاد در استان اصفهان و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های استاندارد جهانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۶۹-۴۶۱

مقدمه

فلج شل حاد (AFP یا Acute flaccid paralysis) یک سندرم بالینی است که با ضعف ناگهانی در عضلات شامل عضلات تنفسی و بلع آغاز می‌شود و

در عرض چند روز تا چند هفته این ضعف به حداکثر شدت خود می‌رسد (۱). وقوع هر مورد AFP یک اورژانس بالینی است که به معاینه‌ی فوری نیاز دارد. تشخیص صحیح AFP از اهمیت ویژه‌ای در درمان و

۱- کارشناس ارشد، گروه مبارزه با بیماری‌ها، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- متخصص عفونی، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: akhtar1343@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: اسماعیل اختر

بهداشت جهانی گواهی‌نامه‌ی منطقه‌ی فاقد فلج اطفال را در سال ۱۹۹۴ به کشورهای حوزه‌ی آمریکا (شامل ۳۶ کشور) و در سال ۲۰۰۰ به کشورهای ساحل غربی اقیانوس آرام (شامل ۳۷ کشور) و کشور چین اعطا کرد. اروپا (شامل ۵۱ کشور) نیز در سال ۲۰۰۲ موفق به دریافت این گواهی‌نامه شد. در حال حاضر، این ویروس تنها در شمال هندوستان، شمال نیجریه و دو کشور همسایه‌ی ایران، افغانستان و پاکستان یافت می‌شود (۸-۶).

منظور از ریشه‌کنی پولیومیلیت این است که هیچ موردی از فلج اطفال دیگر در محیط بروز نکند و ویروس عامل بیماری (ویروس وحشی فلج اطفال) به طور کامل از محیط حذف شود. جهت ریشه‌کنی این ویروس، اجرای همزمان پوشش ایمن‌سازی گسترده با واکسن خوراکی فلج اطفال، افزایش مراقبت از بیمارانی که دچار AFP شده‌اند، شناسایی و ارزیابی همه‌ی افراد مشکوک به فلج اطفال و اجرای برنامه‌ی تکمیلی ایمن‌سازی در مناطقی که از نظر این بیماری اندمیک هستند، لازم است (۷).

شرط لازم جهت رسیدن به هدف ریشه‌کنی بیماری، ارزیابی و پایش روش ریشه‌کنی پولیومیلیت با اجرای نظام مراقبت (Surveillance) از این بیماری می‌باشد. این برنامه یک استراتژی برای جمع‌آوری فعال اطلاعات، از طریق انجام بازدیدهای منظم و برنامه‌ریزی شده از مکان‌هایی است که بیشترین احتمال مراجعه‌ی بیمار مبتلا به AFP به آن‌ها می‌رود. کشورهای زیادی این برنامه را جزء اصول کار خود قرار داده‌اند و در ایران نیز این برنامه همانند برنامه‌های جهانی و بر اساس اولویت‌های منطقه‌ای، با هدف اطمینان از صحت عملکرد این نظام و مطابق

پیش‌آگهی بیماری برخوردار است (۲). در صورت عدم درمان نه تنها احتمال تداوم AFP وجود دارد؛ بلکه می‌تواند با درگیر نمودن عضلات تنفسی موجب مرگ بیمار گردد. تشخیص‌های افتراقی AFP در سنین مختلف متفاوت است. پولیومیلیت، گیلن باره، نوریت ضربه‌ای و میلیت عرضی از شایع‌ترین علل AFP هستند (۳).

پولیومیلیت یک عفونت حاد ویروسی است که به شکل‌های مختلف از عفونت بدون علامت تا مننژیت آسپتیک، فلج و حتی مرگ خود را نشان می‌دهد (۴). در اواخر قرن ۱۹، در بعضی از کشورها اپیدمی‌هایی از بیماری پولیومیلیت پدیدار شد و توجه پژوهشگران را به لزوم پیشگیری و تولید واکسن جهت این بیماری جلب نمود. واکسن کشته و زنده‌ی پولیویروس‌ها در طی دهه‌ی ۱۹۵۰ تهیه شد و به تدریج در مقیاس وسیع در دسترس قرار گرفت (۵).

بدین طریق کنترل بیماری در جهان شروع شد و در سال ۱۹۸۸ میلادی سازمان جهانی بهداشت، راهکار ریشه‌کنی جهانی پولیومیلیت را تا پایان سال ۲۰۰۰ میلادی تصویب نمود (۶). هدف اولیه‌ی برنامه‌ی گسترده‌ی ایمن‌سازی (Expanded program on immunization) افزایش پوشش واکسیناسیون در سال اول زندگی علیه بیماری‌های کشنده‌ی قابل پیشگیری تا ۸۰ درصد در سال ۱۹۹۰ بود (۷).

طبق تعریف، منطقه‌ی فاقد فلج اطفال (Certified polio-free) به منطقه‌ای گفته می‌شود که در سه سال متوالی ویروس فلج اطفال وحشی در آن دیده نشود و نظام مراقبت از AFP با کیفیت بالا در آن اجرا شود. به دنبال اجرای این برنامه، سازمان

مورد مشکوک به ابتلا به فلج اطفال، فردی است که به هر دلیل مانند ابتلا به سندرم گیلن باره دچار AFP شده و سن کمتر از ۱۵ سال داشته باشد و علت دیگری برای فلج شل وی پیدا نشده است.

کلیه‌ی اطلاعات دموگرافیک و اپیدمیولوژیک (سن، شهرستان محل سکونت و تاریخ تولد) و برخی اطلاعات مربوط به بیماری تاریخ بروز فلج، تشخیص اولیه، نتیجه‌ی پیگیری روز ۶۰ بعد از بررسی مجدد و اعلام نتایج آزمایشگاهی، تشخیص نهایی و طبقه‌بندی نهایی در یک فرم گردآوری شد. علاوه بر این، تاریخ بررسی بیماری و وضعیت نمونه‌گیری (تاریخ اخذ نمونه‌های مدفوع شامل دو نمونه یکی بلافاصله بعد از تشخیص و دیگری ۴۸-۲۴ ساعت بعد از تشخیص) و تاریخ تحویل به آزمایشگاه نیز مورد بررسی قرار گرفتند. سپس میزان تطابق رعایت این شاخص‌ها با استاندارد سازمان جهانی بهداشت مورد مقایسه قرار گرفت.

اصلی‌ترین معیارهای این استاندارد جهت ارزیابی برنامه‌ی ریشه‌کنی پولیومیلیت در ایران، طبق دستورالعمل کشوری مراقبت از فلج شل حاد به شرح زیر می‌باشند:

- ۱) میزان بروز AFP غیر پولیومی به ازای ۱۰۰۰۰۰ کودک زیر ۱۵ سال که باید حداقل ۲ باشد (نشان دهنده‌ی حساسیت برنامه‌ی مراقبت است).
- ۲) شاخص کشف موارد (۸۰ درصد > هدف): هر مورد فلج شل حاد، حداکثر ظرف مدت ۷ روز کشف و گزارش شود.
- ۳) شاخص بررسی موارد: تمام موارد AFP گزارش شده، حداکثر در عرض ۴۸ ساعت بررسی شود و وقوع AFP مورد تأیید قرار گیرد.

با استاندارد بودن شاخص‌های آن، بهبود کیفیت و انجام اصلاحات لازم از سال ۱۳۷۱ اجرا می‌شود (۹). سطوح فعلی نظام مراقبت این امکان را فراهم آورده است تا بتوان کاهش چشمگیر بیماری‌زایی پولیومیلیت را نشان داد. البته مشاهدات روزمره در مرکز بهداشت استان اصفهان حاکی از برخی مشکلات در زمینه‌ی نظام مراقبت AFP است. برخی از این مشکلات، شامل گزارش‌دهی نامنظم و ناقص مراکز درمانی بخش خصوصی و یا موارد کشف AFP کمتر از حد انتظار استاندارد سازمان بهداشت جهانی می‌باشد. از طرفی، کشف هر مورد AFP می‌تواند منجر به اقدامات مناسب و سریع درمانی و همچنین پیشگیری از موارد قابل انتقال گردد و در نتیجه، باعث کنترل بهتر این موارد گردد. از این رو، با توجه به اهمیت این موضوع، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین وضعیت شاخص‌های ریشه‌کنی فلج اطفال در اصفهان از سال ۸۶-۱۳۸۲ و مقایسه‌ی آن با شاخص‌های استاندارد جهانی طرح‌ریزی شد. نتایج این پژوهش می‌تواند در جهت برنامه‌ریزی بهداشتی بهتر، شناسایی و برطرف سازی نواقص سیستم مراقبت AFP و همچنین رفع این نواقص مؤثر باشد.

روش‌ها

در این مطالعه که یک بررسی به روش توصیفی-مقطعی بدون جهت بود، کلیه‌ی موارد AFP گزارش شده در استان اصفهان در سال‌های ۸۶-۱۳۸۲، که توسط خانه‌های بهداشت و مراکز بهداشتی-درمانی شهری و روستایی دولتی و خصوصی به مرکز بهداشت شهرستان و استان گزارش شده‌اند، به روش سرشماری مورد مطالعه قرار گرفتند. طبق تعریف،

۶۱۰ خانه‌ی بهداشت، مسؤول رسیدگی به سلامت ساکنان آن می‌باشند. در بین سال‌های ۸۶-۱۳۸۲ تعداد ۱۱۵ مورد بیمار مبتلا به AFP به مرکز مبارزه با بیماری‌های استان اصفهان گزارش شد که از این میان، ۴۱ درصد زن و ۵۹ درصد مرد بودند. میانگین سنی مراجعین $3/83 \pm 5/71$ سال، با دامنه‌ی سنی ۱-۱۵ سال بود. تعداد مراجعین از سال ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۶ رو به کاهش بود؛ به طوری که در این سال‌ها، به ترتیب ۳۷، ۲۱، ۲۵، ۱۶ و ۱۶ نفر با AFP مراجعه کرده بودند.

طبق گزارش‌های مرکز آمار کشور (۱۰)، جمعیت کودکان زیر ۱۵ سال در استان اصفهان در این سال‌ها به ترتیب ۱۰۵۲۱۰۶، ۱۰۰۹۶۳۸، ۹۶۰۲۰۴، ۹۲۱۵۲۷ و ۹۲۴۸۸۴ بود که بنابراین، میزان بروز در این سال‌ها به ترتیب ۳/۵۲، ۲/۰۸، ۲/۶۰، ۱/۷۴ و ۱/۷۳ به ازای ۱۰۰۰۰۰ کودک زیر ۱۵ سال بود که میانگین بروز ۱/۷۴ محاسبه شد. این شاخص باید حداقل ۲ باشد و کمتر از میزان مورد انتظار است و بنابراین، حساسیت تشخیص باید افزایش یابد. خلاصه‌ای از حد نصاب شاخص‌ها و مقادیر به دست آمده‌ی شاخص‌ها در اصفهان در جدول ۱ آمده است.

۴) شاخص به هنگام بودن نمونه‌گیری (۸۰ درصد > هدف): ۲ نمونه‌ی مدفوع مناسب حداکثر طی ۱۴ روز پس از بروز فلج جمع‌آوری گردد.

۵) شاخص ارسال به هنگام نمونه‌ها به آزمایشگاه (۸۰ درصد > هدف): نمونه‌ها حداکثر طی ۳ روز به آزمایشگاه واصل شود.

۶) شاخص پیگیری روز ۶۰ (۹۰ درصد > هدف): پیگیری بیمار مبتلا به AFP پس از ۶۰ روز بعد از بروز فلج صورت پذیرد.

۷) تمام موارد مبتلا به AFP حداکثر ظرف ۷۰ روز پس از بروز فلج طبقه‌بندی شود و تشخیص نهایی آن مشخص گردد.

اطلاعات پس از مرور پرونده‌های بیماران استخراج و طبقه‌بندی شد و توسط نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

استان اصفهان با مساحت ۱۰۷ هزار کیلومتر مربع حدود ۴ میلیون نفر جمعیت دارد که ۱۷۹ مرکز بهداشت شهری و ۱۰۵ مرکز بهداشت روستایی و

جدول ۱. حد نصاب شاخص‌ها و مقدار به دست آمده‌ی شاخص‌ها در اصفهان در پنج سال و در سال آخر

شاخص	میانگین \pm انحراف معیار	شاخص در پنج سال (درصد)	شاخص در سال آخر (درصد)	حد نصاب مورد انتظار
شاخص کشف موارد (روز)	$4/27 \pm 5/66$	۸۹/۶	۸۱/۳	۸۰ درصد در عرض ۷ روز
شاخص بررسی موارد (روز)	$0/17 \pm 0/53$	۹۸/۳	۱۰۰	۸۰ درصد در عرض ۴۸ ساعت
شاخص به هنگام بودن نمونه‌گیری مدفوع (۲ نمونه) (روز)	$8/97 \pm 5/62$	۹۵/۷	۰	۸۰ درصد در عرض ۲ روز
شاخص ارسال به هنگام نمونه‌ها به آزمایشگاه (روز)	$2/66 \pm 1/23$	۸۴/۲	۸۷/۵	۸۰ درصد در عرض ۳ روز
شاخص پیگیری روز ۶۰ (روز)	$51/85 \pm 14/02$	۷۴/۱	۹۳/۷	۹۰ درصد
شاخص طبقه‌بندی موارد (روز)	---	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰ درصد طی ۷۰ روز

ارسال شوند، بیشتر بود و مناسب ارزیابی شد. میانگین زمان پیگیری دو ماهه، $51/85 \pm 14/02$ روز بود و $74/1$ درصد از بیماران در عرض ۶۰ روز پیگیری شده بودند. در حالی که طبق معیارها، بیش از ۹۰ درصد بیماران باید در عرض ۶۰ روز پیگیری مجدد شوند. در اصفهان، $90/2$ درصد بیماران بعد از ۶۱ روز مورد بررسی مجدد قرار گرفته بودند و حداکثر زمان پیگیری بیماران ۷۰ روز بود و تشخیص قطعی برای کلیه‌ی بیماران در عرض ۷۰ روز مطرح شده بود. بنابراین، شاخص طبقه‌بندی موارد در استان اصفهان در این پنج سال ۱۰۰ درصد بود.

هیچ موردی از AFP ناشی از پولیومیلیت در این سال‌ها گزارش نشد و بیشترین علت AFP سندرم گیلن باره با شیوع $70/4$ درصد بود. تشخیص اولیه‌ی مطرح شده برای ۱۰۵ مورد ($91/3$ درصد) از ۱۱۵ بیمار، سندرم گیلن باره بود که در نهایت برای ۸۱ مورد ($70/4$ درصد) تشخیص گیلن باره قطعی شد. ۱۷ مورد ($14/8$ درصد) تشخیص نهایی تومور سیستم اعصاب مرکزی، یک مورد پولیومیلیت پارالیتیک ناشی از واکسن (VAAP یا Vaccine-associated paralytic poliomyelitis)، ۲ نفر عفونت سیستم اعصاب مرکزی، ۳ نفر نوروپاتی یا میلوپاتی و ۳ نفر اتروپاتی ویروسی داشتند.

در سال ۱۳۸۶ (سال آخر بررسی موارد)، با میزان بروز فلج شل حاد $1/74$ درصد، ۱۶ مورد مراجعه کرده بودند که ۳ نفر از آن‌ها زن ($18/75$ درصد) و بقیه مرد بودند. از این میان، چهار نفر در منطقه‌ی یک اصفهان، سه نفر در منطقه‌ی دو اصفهان، دو نفر در برخوار، دو نفر در گلپایگان، یک نفر در سمیرم، یک نفر در فولادشهر، یک نفر در بادرود، یک نفر در

میانگین زمان کشف AFP، $4/27 \pm 5/66$ روز بود که در مجموع، $89/6$ درصد موارد تا ۷ روز بعد از بروز بیماری تشخیص داده شده بود، که طبق تعریف، شاخص کشف موارد بیش از ۸۰ درصد و مناسب می‌باشد. حداکثر زمان تشخیص بیماری ۲۰ روز بعد از بروز علائم بود.

میانگین زمان بررسی و معاینه‌ی بیماران $0/17 \pm 0/53$ بود و در $87/7$ درصد بیماران معاینات به محض تشخیص، انجام شده بود که این زمان در مورد همه‌ی بیماران به حداکثر ۳ روز می‌رسید. طبق تعریف، ۸۰ درصد موارد باید در عرض ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گیرند. در اصفهان نیز تنها ۲ بیمار ($1/7$ درصد) بعد از ۴۸ ساعت جهت تأیید وقوع AFP مورد بررسی قرار گرفته بودند و فلج شل $98/3$ درصد از بیماران در عرض ۳ روز بررسی شده بود.

میانگین زمان اخذ دو نمونه‌ی مدفوع $8/97 \pm 5/62$ روز بود که بعد از ۱۴ روز، برای $95/7$ درصد از بیماران، هر دو نمونه‌ی مدفوع ارسال شده بود. با توجه به این که شاخص به هنگام بودن نمونه‌گیری در عرض ۱۴ روز طبق معیارهای جهانی باید بیش از ۸۰ درصد باشد، این عدد در اصفهان با معیارهای جهانی منطبق بود. حداکثر زمان ارسال نمونه‌ی مدفوع ۲۲ روز بود.

میانگین زمان رسیدن نمونه‌ی مدفوع به آزمایشگاه $1/23 \pm 2/66$ روز بود که $84/2$ درصد از نمونه‌ها طی ۳ روز به آزمایشگاه رسیده بود و حداکثر زمان ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه ۷ روز بود. این شاخص نیز در اصفهان با توجه به این که طبق معیارها باید حداقل ۸۰ درصد نمونه‌ها در عرض ۳ روز به آزمایشگاه

در شهرهای مختلف ایران نیز در سال‌های ۰۸-۲۰۰۶ این مقدار بسیار متفاوت بوده است و در بعضی استان‌ها مانند قزوین، قم، کردستان، گیلان، لرستان، مازندران، مرکزی، هرمزگان و ... میزان بروز بیش از ۲ درصد AFP گزارش شده است (۱۳). در سال ۲۰۱۲، تنها در چهار محال و بختیاری، تربت حیدریه و بوشهر این شاخص کمتر از حد برآورد آن بوده است (۱۲).

از بین کلیه ۱۱۵ مورد مبتلا به AFP در سال‌های ۸۶-۱۳۸۲، هیچ موردی به بیماری پولیومیلیت در اصفهان مبتلا نبود. در ایران در سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۶ مواردی از این ویروس گزارش شد که اکثر موارد از استان سیستان و بلوچستان بود (۱۲-۱۱)؛ اما از سال ۲۰۰۰ (۱۳۷۹) به بعد موارد گزارش شده از این ویروس در ایران به صفر رسیده است (۱۲). در سال ۲۰۰۸ در خاورمیانه، کل گزارش‌های بیماری فلج اطفال ۱۰ مورد (همه‌ی موارد فرم وحشی ویروس فلج اطفال) بود، در حالی که در جهان این مقدار به ۳۶۳ مورد (۳۵۴ مورد تأیید شده‌ی فرم وحشی ویروس فلج اطفال) می‌رسید (۱۱). در سال ۲۰۱۲، در مجموع ۲۳۲ مورد فلج اطفال گزارش شد که نسبت به سال ۲۰۱۱ (۶۵۰ مورد) کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد (۱۲).

برای ۸۹/۶ درصد از افراد در عرض ۷ روز، بیماری AFP کشف شده بود که مناسب است. این مقدار در سال‌های گذشته در اصفهان ۱۰۰ درصد بوده و بنابراین کاهش یافته است (۱۳). میزان کشوری این شاخص در سال ۲۰۱۲، ۸۵ درصد بوده است. با این حال در استان‌های ایلام، خراسان شمالی، تهران، جیرفت، زابل، کاشان، کهگیلویه و بویر احمد، گیلان، مرکزی و هرمزگان این شاخص کماکان کمتر

نابین و یک نفر در خمینی‌شهر تشخیص داده شدند. تشخیص اولیه‌ی ۱۵ بیمار، سندرم گیلن باره بود و برای یک مورد تشخیص خاصی مطرح نشده بود. تشخیص نهایی ۷ مورد نیز در نهایت سندرم گیلن باره عنوان شد و ۲ نفر به علت عفونت سیستم اعصاب مرکزی و یک نفر به علت انتروپاتی ویروسی دچار AFP شده بودند.

فلج شل حاد همه‌ی این بیماران در عرض ۱۰ روز تشخیص داده شده بود و ۸۱/۳ درصد در عرض ۷ روز شناسایی شده بودند. همه‌ی موارد در عرض ۴۸ ساعت اول مورد بررسی و معاینه قرار گرفته بودند، اما برای هیچ یک شاخص گرفتن دو نمونه‌ی مدفوع، کمتر از دو روز نبود. شاخص ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه در عرض ۳ روز نیز در این افراد به ۸۷/۵ درصد می‌رسید و دو مورد در روز چهار ارسال شده بود.

بحث

این مطالعه، نتایج نظام مراقبت از AFP را در شهر اصفهان در سال‌های ۸۶-۱۳۸۲ بررسی نمود و آن را با مقیاس‌های برنامه‌ی جهانی ریشه‌کنی فلج اطفال مقایسه کرد. با توجه به نادر بودن موارد فلج اطفال در سال‌های گذشته، انجام چنین مطالعه‌ای لازم می‌نمود. شاخص شناسایی موارد فلج شل حاد غیرپولیومی، مهم‌ترین شاخص نظام مراقبت از AFP می‌باشد. طبق مطالعه‌ی حاضر، در اصفهان در سال‌های ۸۶-۱۳۸۲، تعداد موارد گزارش شده‌ی فلج شل حاد کمتر از حد مورد انتظار بود. میزان تشخیص AFP در ایران در سال‌های ۱۲-۲۰۰۰ رو به افزایش بوده است و این موضوع نشان دهنده‌ی بهبود نظام مراقبت می‌باشد (۱۲).

از ۸۰ درصد می‌باشد (۱۲).

شاخص بررسی موارد در این پنج سال به طور میانگین $98/3$ درصد و در سال آخر ۱۰۰ درصد بود که این شاخص در ایران در سال ۲۰۱۲ نیز ۹۹ درصد بوده است و هم‌اکنون مراکز کشور به حد نصاب این شاخص دست یافته‌اند و ظرف ۴۸ ساعت مورد AFP تحت بررسی قرار گرفته است (۱۲).

در اصفهان، مقدار نمونه‌گیری مدفوع در این سال‌ها نیز از میزان مورد انتظار طبق دستورالعمل‌های جهانی نیز بیشتر بوده است. این میزان در جهان در سال ۲۰۰۸ ۸۸ درصد گزارش شده است (۱۱) که در خاورمیانه این عدد به میانگین ۹۲ درصد رسیده است (۱۳) و در اصفهان نیز همین حدود بوده است. در ایران در سال ۲۰۱۲ تنها شهرهای کهگیلویه و بویراحمد، سبزواری، جیرفت، خراسان شمالی، تربت حیدریه و ایلام این شاخص کمتر از حد برآورد بوده است (۱۲). در اصفهان این مقدار در سال ۲۰۰۰، $61/5$ درصد؛ در سال ۲۰۰۱، ۷۷ درصد و در سال ۲۰۰۲، $88/9$ درصد بود که در این سال برای اولین بار به حد نصاب مورد نظر رسیده است (۱۳) و کماکان سیر رو به افزایش داشته است؛ به طوری که در این پنج سال، $95/7$ درصد از نمونه‌ها در عرض ۴۸ ساعت ارسال شده‌اند. به طور تقریبی، می‌توان گفت در اکثر استان‌های ایران از این نظر نظام مراقبت از AFP موفق عمل کرده است (۱۳).

شاخص ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه در عرض سه روز در اصفهان در این مدت $84/2$ درصد بود که در سال آخر $87/5$ درصد گزارش شده است. این میزان نسبت به سال‌های قبل در استان اصفهان تغییر چندانی نداشته است (۱۳). هم‌زمان با انجام این مطالعه،

در سایر استان‌های ایران نیز شرایط مشابهی وجود داشته است (۱۳). در سال ۲۰۱۲، این شاخص در ۱۴ شهر کشور کمتر از حد برآورد بود و برنامه‌ریزی و هماهنگی لازم جهت ارسال به موقع نمونه‌ها به آزمایشگاه در این مراکز باید انجام شود (۱۲).

شاخص پیگیری موارد در عرض ۶۰ روز در سال‌های ۸۶-۱۳۸۲ در استان اصفهان $74/1$ درصد و در سال آخر $93/7$ درصد بود که نسبت به سال‌های قبل کاهش نشان می‌داد. این میزان در سال‌های گذشته رو به افزایش و مطابق با شاخص‌های جهانی بود؛ در حالی که در سال‌های اخیر بار دیگر این شاخص کاهش یافته است (۱۳). در سال ۲۰۱۲ در ایران کلیه‌ی شهرها به حد نصاب این شاخص دست یافتند و در همه‌ی شهرها ۱۰۰ درصد موارد AFP ظرف ۶۰ روز مورد بررسی مجدد قرار گرفتند (۱۲).

ریشه‌کنی فلج اطفال باعث صرفه‌جویی هزینه‌های ایمن‌سازی جاری علیه فلج اطفال، عدم ابتلا به فلج اطفال و بنابراین کاهش مرگ و میر و عوارض فلج ناشی از بیماری و کاهش هزینه‌های توانبخشی و درمان و نیز ضایعات روانی ناشی از وجود فرد معلول در خانواده می‌شود. مشخص است که ریشه‌کنی فلج اطفال نیاز به یک نظام مراقبت عالی جهت شناسایی کلیه‌ی موارد مشکوک و انجام واکسیناسیون گسترده دارد. طبق مطالعه‌ی حاضر، نظام مراقبت در اصفهان جهت تشخیص موارد مبتلا به AFP دقیق عمل می‌کند، اما همچنان جهت ریشه‌کنی این بیماری نیاز به ارزیابی بیشتر و بهبود کیفیت نظام مراقبت وجود دارد. بنابراین ادامه‌ی واکسیناسیون گسترده علیه ویروس فلج اطفال و پیگیری بیماران مبتلا به این بیماری توصیه می‌شود.

مهران صادقی دستیار محترم داخلی قلب و تمامی کارشناسان محترم مبارزه با بیماری‌های شهرستان‌های تابعه‌ی استان اصفهان تقدیر به عمل می‌آید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر مسعود زندیه مدیر محترم گروه مبارزه با بیماری‌های معاونت بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و جناب آقای دکتر

References

1. Marx A, Glass JD, Sutter RW. Differential diagnosis of acute flaccid paralysis and its role in poliomyelitis surveillance. *Epidemiol Rev* 2000; 22(2): 298-316.
2. Alexander LN, Seward JF, Santibanez TA, Pallansch MA, Kew OM, Prevots DR, et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA* 2004; 292(14): 1696-701.
3. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases. New York, NY: John Wiley and Sons; 1979.
4. Malzberg MS, Rogg JM, Tate CA, Zayas V, Easton JD. Poliomyelitis: hyperintensity of the anterior horn cells on MR images of the spinal cord. *AJR Am J Roentgenol* 1993; 161(4): 863-5.
5. Aylward RB, Acharya A, England S, Agocs M, Linkins J. Global health goals: lessons from the worldwide effort to eradicate poliomyelitis. *Lancet* 2003; 362(9387): 909-14.
6. World Health Organization. WHA41.28 Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Proceedings of the 41th World Health Assembly; 1988 May 2-13; Geneva, Switzerland.
7. Fiore L, Novello F, Simeoni P, Amato C, Vellucci L, De SD, et al. Surveillance of acute flaccid paralysis in Italy: 1996-1997. AFP Study Group. Acute flaccid paralysis. *Eur J Epidemiol* 1999; 15(8): 757-63.
8. Hull HF, Birmingham ME, Melgaard B, Lee JW. Progress toward global polio eradication. *J Infect Dis* 1997; 175(Supplement 1): S4-S9.
9. Nooraei M, Vaziran P, Nadim A. Evaluation of a care program with example of poliomyelitis in Iran. *J Guilan Univ Med Sci* 2000; 9(33-34): 47-54. [In Persian].
10. Statistical Centre of Iran. [Online]. [cited 2013]; Available from: URL: www.amar.org.ir.
11. Davarpanah M, Bakhtiari H, Mehrabani D, Khademolhosseini F. A 12-years surveillance of poliomyelitis and acute flaccid paralysis in Fars Province, Southern Iran. *Iran Red Crescent Med J* 2008; 10(4): 288-93.
12. World Health Organization. Progress towards global poliomyelitis eradication: preparation for the oral poliovirus vaccine cessation era. *Wkly Epidemiol Rec* 2004;79(39):349-55.
13. Deputy of Health Website. Vaccine Preventable Diseases [Online]. [cited 2014]; Available from: URL:<http://port.health.gov.ir/mfdc/epi>

Evaluation of the Surveillance System for Acute Flaccid Paralysis (AFP) in Iran during the Years 2003-2007 and Its Comparison with Worldwide Standards

Esmaeil Akhtar MSc¹, Reza Fadaei-Nobari MD²

Short Communication

Abstract

Background: This study aimed to evaluate the surveillance system for acute flaccid paralysis (AFP) in Iran during the years 2003-2007 and compare it with worldwide standards.

Methods: In this cross-sectional study, we analyzed all cases of acute flaccid paralysis reported to health centers in Isfahan province, Iran, from 2003 to 2007. Required information was gathered after reviewing the medical records of patients, and was analyzed using SPSS software.

Findings: A total of 115 patients with acute flaccid paralysis were reported, out of which 41% were women and 59% were men. Mean age of subjects was 5.71 ± 3.83 , ranging from one to fifteen years. The average incidence of acute flaccid paralysis was 1.74%, which was lower than expected (2). Among the national indicators including case notification (80% within 7 days <), case investigation (80% within 48 hours <), specimen collection (80% within 14 days <), specimen transport and testing (80% within 3 days <), 60 days of follow-up (90% <), and classification of cases (100% within 70 days), only the two indicators of case investigation and 60 days of follow-up were less than the expected level compared with global standards.

Conclusion: Based on the present study, the surveillance of acute flaccid paralysis cases is working properly, but further evaluation and improving the quality of health care systems is required for the eradication of this disease. Thus, continuing the massive vaccination against polio virus and following up of patients with this disease is recommended.

Keywords: Acute flaccid paralysis, Eradication surveillance system, Isfahan, Iran

Citation: Akhtar E, Fadaei-Nobari R. **Evaluation of the Surveillance System for Acute Flaccid Paralysis (AFP) in Iran during the Years 2003-2007 and Its Comparison with Worldwide Standards.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 461-9

1- Department of Vaccine Preventable Diseases, Center for Communicable Diseases Control, Deputy of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Specialist in Infectious Diseases, Deputy of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Esmaeil Akhtar MSc, Email: akhtar1343@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:

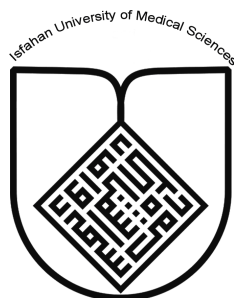
- a. **Article:** Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
 - b. **Chapter in a book:** Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations 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 printout 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 information 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 \pm standard deviation must be given. Statistical method must be mentioned and specify any general computer program used.
8. **Results:** It must be presented in the form of text, tables and illustrations. The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion parts) to clarify their contents.
9. **Discussion:** This should emphasize the present findings and the variations or similarities with other work done in the field by other workers. The detailed data should not be repeated in the discussion again. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. It must be mentioned whether the hypothesis mentioned in the article is true, false or no conclusions can be derived.
10. **Acknowledgement:** All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgement section. It should include persons who provided technical help, writing assistance and departmental head who only provided general support. Financial and material support should also be acknowledged.
11. **Tables:** In limited numbers should be submitted with the **captions placed above**. Do not submit tables as photograph. Place explanatory matters in footnotes, not in the heading.
12. **Figures:** Should be in limited numbers, with high quality art work and mounted on separate pages. The captions **should be placed below**. The same data should not be presented in tables, figures and text, simultaneously.
13. **References:** Should be as **Vancouver style**. All manuscripts should be accompanied by relevant references. The author should ensure reference to locally published studies by doing proper literature search. It may not be possible for the editor and reviewers to check the accuracy of all reference citations. To minimize such

Editorial Board (In alphabetical order)

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



JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 32, No. 280, 1st week, June 2014

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

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

Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

E-mail: publications@mui.ac.ir

Office:

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

Telefax: +98 311 7922291

E-mail: jims@med.mui.ac.ir

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

Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy edit, Layout edit, Design and Print:

Farzanegan Radandish Co.

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

Telefax: +98 311 6686302

E-mail: esfahanfarzanegan@yahoo.com

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexers

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

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

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