

### مقاله های پژوهشی

- ۲۱۶۷ ..... بررسی آلودگی گزهای تولید شده در شهر اصفهان به باقی مانده آفاتوکسین سمیرا دهقانی، دکتر مسعود سامی، دکتر مریم میرلویحی
- ۲۱۷۲ ..... بررسی ارزش تشخیصی نقطه ی طب سوزنی Lanwei جهت تشخیص آپاندیسیت حاد دکتر مهران رضوانی، هلیا عمیدی، دکتر سید مرتضی حیدری، دکتر سید علیرضا حسینی، دکتر رضا اشراقی سامانی
- ۲۱۷۹ ..... شناسایی جهش IVSII-I ژن بتا گلوبین در ناقلین تالاسمی Minor با استفاده از روش High-Resolution Melting (HRM) فاطمه آخوندی، دکتر مجتبی عمادی بایگی، دکتر منصور صالحی، دکتر پروانه نیک پور
- ۲۱۸۷ ..... بررسی تأثیر پیش گیرانه ی تزریق میدازولام، اندانسترون و ترکیب میدازولام- اندانسترون روی تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی گوش میانی و مقایسه ی آن با گروه شاهد دکتر عظیم هنرمند، دکتر سید محمد رضا صفوی، منصوره چگنی
- ۲۱۹۳ ..... مطالعه ی اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی (IVF) موش های مبتلا به آنمی همولیتیک ناشی از تزریق فنیل هیدرازین؛ بررسی اثر بهبودبخشی ژل رویال و ویتامین C دکتر حجت عنبر، دکتر رسول شهبوز، دکتر مزدک رازی، دکتر حسن ملکی نژاد، دکتر غلامرضا نجفی، دکتر سید رشید تونی
- ۲۲۰۴ ..... تشخیص اختلال شناختی خفیف با تخمین چگالی ماده ی خاکستری با استفاده از مورفومتری مبتنی بر Voxel در تصاویر MRI مغزی زهرا کریمی، دکتر سعید کرمانی، دکتر مجید برکتین

### مقاله مروری

- ۲۲۱۳ ..... اسیدهای نوکلئیک جنینی در خون مادر برای تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد میثم مصلاهی، دکتر رسول صالحی

### Original Articles

- The Contamination of "Gaz" to Aflatoxin Residue in Isfahan City, Iran ..... 2171  
 Samira Dehghani, Masoud Sami PhD, Maryam Mirlohi PhD
- Diagnostic Value of Lanwei Acupuncture Point for Acute Appendicitis ..... 2178  
 Mehran Rezvani MD, Helia Amidi, Seyed Morteza Heydari MD, Seyed Alireza Hosseiny MD MD, Reza Eshraghi-Samani MD
- Detection of IVSII-1 Mutation of Beta Globin Gene in Carriers of Thalassemia Minor Using High-Resolution Melting Analysis ..... 2186  
 Fatemeh Akhondi MSc, Mojtaba Emadi-Baygi PhD, Mansour Salehi PhD, Parvaneh Nikpour PhD
- Prophylactic Antiemetic Effects of Midazolam, Ondansetron and their Combination after Middle Ear Surgery ... 2192  
 Azim Honarmand MD, Seyed Mohammad Reza Safavi MD, Mansoureh Chegeni
- The Sperm and In-Vitro Fertilization (IVF) of Mice with Phenylhydrazine-Induced Hemolytic Anemia; Ameliorating the Effect of Royal Jelly and Vitamin C ..... 2203  
 Hojat Anbara DVM, Rasoul Shahrooz PhD, Mazdak Razi PhD, Hasan Malekinejad PhD, Gholamreza Najafi PhD, Seyed Rashid Touni DVM
- Diagnosis of Mild Cognitive Impairment (MCI) via Estimating the Density of Gray Matter Using Voxel-Based Morphometry (VBM) in the Brain Magnetic Resonance Imaging (MRI) ..... 2212  
 Zahra Karimi, Saeed Kermani PhD, Majid Barekatin MD
- Review Article
- Fetal Nucleic Acids in Maternal Circulation for Noninvasive Prenatal Diagnosis ..... 2218  
 Meysam Mosallayi, Rasoul Salehi PhD



# مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۶۳)، هفته سوم بهمن ۱۳۹۴

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر مریم راد احمدی

## 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

مسئول دفتر: گلناز رجبی

دورنگار: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۹۱

تلفن: ۰۳۱-۳۶۶۹۴۷۳۷

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

http://www.journals.mui.ac.ir/jims

وب سایت مجله:

## امور نشر:

(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)

شرکت فرزاتگان راداندیش

اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵

تلفن و دورنگار: ۰۳۱-۳۶۶۸۶۳۰۲

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

تیراژ: ۵۰۰ نسخه

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

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

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

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

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

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

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

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

نحوه ارسال دست نوشته‌ها در سامانه

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

توجه به نکات زیر در ارسال مقاله ضروری است:

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

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

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

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

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

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

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

- در مرحله دوم بعد از این که دست نوشته از نظر همراستایی و فرمت مجله مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت و تأییدیه دفتر مجله در خصوص قابل ارجاع بودن آن دست نوشته برای شروع فرایند داوری ارسال گردید، ضروری است ۵۰ درصد کل هزینه به منظور شروع فرآیند داوری به عنوان (Processing fee) بر اساس موارد ذکر شده در بخش هزینه انتشار راهنمای نویسندگان پرداخت گردد. این هزینه غیر قابل برگشت می‌باشد. سپس فایل مربوط به تصویر اسکن شده فیش پرداختی فقط با نام نویسنده مسؤول از طریق سایت به دفتر مجله ارسال گردد. لازم به ذکر است تنظیم دست نوشته بر اساس فرمت مجله، و پرداخت وجه اولیه فقط جهت ارسال به داوران بوده و دال بر پذیرش آن نمی‌باشد.

نحوه ارایه مقاله

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

- ارسال مقاله فقط از طریق سایت پذیرفته می‌شود.

- زبان رسمی مجله، فارسی است و مقالات فقط به زبان فارسی همراه با چکیده انگلیسی قابل پذیرش هستند.

- دست نوشته‌های به زبان‌های غیر از فارسی و ترجمه شده در این مجله منتشر نمی‌شود.

- مقالات باید پژوهشی و حاصل تحقیق نویسنده یا نویسندگان در زمینه علوم پزشکی (پایه و بالینی) و رشته‌های مرتبط بوده که پیش از این به انگلیسی یا فارسی در سایر مجلات منتشر نشده باشد و یا به طور همزمان به مجلات دیگر نیز ارسال نگردیده باشد.

- این مجله مقالات شامل انواع اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را در منتشر می‌نماید.

- فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین نیز توسط این مجله انتشار می‌یابد.

- مقالات قابل انتشار در مجله علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی اصفهان شامل موارد زیر می‌باشند.

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

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

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

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

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

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

تبصره ۱- مقالات ترجمه پذیرفته نمی‌شود.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- روش‌ها: این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط 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 نرم افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

نمونه انگلیسی:

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

نمونه فارسی:

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

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

- اگر منبع مورد نظر کتاب است:

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

نمونه انگلیسی:

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

نمونه فارسی:

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

- اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

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

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

- منابع به صورت پایان نامه

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

- منابع به صورت الکترونیکی - مجله الکترونیکی روی اینترنت

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

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

منابع به صورت صفحه وب

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

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

- نمونه خوانی (**Proofreading**): یک نسخه از مقاله پیش از چاپ جهت انجام اصلاحات ضروری و بر طرف کردن اشکالات احتمالی برای نویسنده مسؤل ارسال می گردد که لازم است در کوتاه ترین زمان تغییرات مورد نظر مجله انجام داده، از طریق وبسایت مجله ارسال نماید.

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

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

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

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

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





## فهرست مطالب

### مقاله‌های پژوهشی

- ۲۱۶۷..... بررسی آلودگی گزهای تولید شده در شهر اصفهان به باقی‌مانده آفاتوکسین.....  
سمیرا دهقانی، دکتر مسعود سامی، دکتر مریم میرلوحی
- ۲۱۷۲..... بررسی ارزش تشخیصی نقطه‌ی طب سوزنی **Lanwei** جهت تشخیص آپاندیسیت حاد.....  
دکتر مهران رضوانی، هلیا عمیدی، دکتر سید مرتضی حیدری، دکتر سید علیرضا حسینی، دکتر رضا اشراقی سامانی
- ۲۱۷۹..... شناسایی جهش **IVSII-I** ژن بتا گلوبین در ناقلین تالاسمی **Minor** با استفاده از روش **High-Resolution Melting (HRM)**.....  
فاطمه آخوندی، دکتر مجتبی عمادی بایگی، دکتر منصور صالحی، دکتر پروانه نیک‌پور
- بررسی تأثیر پیش‌گیرانه‌ی تزریق میدازولام، اندانسترون و ترکیب میدازولام- اندانسترون روی تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی گوش میانی و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد.....  
۲۱۸۷.....  
دکتر عظیم هنرمند، دکتر سید محمدرضا صفوی، منصوره چگنی
- ۲۱۹۳..... مطالعه‌ی اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی (**IVF**) موش‌های مبتلا به آنمی همولیتیک ناشی از تزریق فیبل هیدرازین: بررسی اثر بهبودبخشی ژل رویال و ویتامین C.....  
دکتر حجت عنبر، دکتر رسول شهبوز، دکتر مزدک رازی، دکتر حسن ملکی‌نژاد، دکتر غلامرضا نجفی، دکتر سید رشید تونی
- ۲۲۰۴..... تشخیص اختلال شناختی خفیف با تخمین چگالی ماده‌ی خاکستری با استفاده از مورفومتری مبتنی بر **Voxel** در تصاویر **MRI** مغزی.....  
زهرا کریمی، دکتر سعید کرمانی، دکتر مجید برکتین

### مقاله مروری

- ۲۲۱۳..... اسیدهای نوکلئیک جنینی در خون مادر برای تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد.....  
میثم مصلاهی، دکتر رسول صالحی

## بررسی آلودگی گزهای تولید شده در شهر اصفهان به باقی مانده آفاتوکسین

سمیرا دهقانی<sup>۱</sup>، دکتر مسعود سامی<sup>۲</sup>، دکتر مریم میرلوحی<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** آفاتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه سمی و سرطان‌زا هستند که توسط قارچ‌هایی از قبیل *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus flavus* و به ندرت توسط *Aspergillus nomius* تولید می‌شوند. این قارچ‌ها تحت شرایط رطوبت و دمای مناسب، قادر خواهند بود که در محصولات کشاورزی رشد و تکثیر نمایند و در ادامه، آفاتوکسین تولید کنند. هدف از انجام این مطالعه، تعیین میزان آفاتوکسین کل در گزهای تولید شده در شهر اصفهان بود.

**روش‌ها:** ۴۰ نمونه گز حاوی ۲۸ و ۴۰ درصد مغز پسته از کارگاه‌های سطح شهر اصفهان خریداری شد و میزان آفاتوکسین کل در آن‌ها با استفاده از روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ارزیابی گردید.

**یافته‌ها:** غلظت کلی آفاتوکسین در ۴۰ نمونه گز آزمایش شده، بین ۱۳/۹۷ نانوگرم/گرم تا غیر قابل تشخیص بود. ۳۹ نمونه (۹۷/۵ درصد) دارای آلودگی بود و میانگین آفاتوکسین کلی در نمونه‌ها  $4/11 \pm 3/55$  نانوگرم/گرم تعیین گردید. میانگین آلودگی در نمونه‌های گز ۲۸ و ۴۰ درصد مغز پسته، به ترتیب  $3/53 \pm 2/49$  و  $4/40 \pm 4/70$  نانوگرم/گرم به دست آمد و اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ( $P = 0/82$ ). میزان آفاتوکسین کل در تمامی نمونه‌ها کمتر از حداکثر تعیین شده توسط سازمان ملی استاندارد ایران (۱۵ نانوگرم/گرم) بود، اما در ۴ نمونه (۱۰ درصد) میزان آفاتوکسین کل بیشتر از استاندارد کشورهای اروپایی (۱۰ نانوگرم/گرم) بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اهمیت اقتصادی گز به خصوص صادرات آن به بازارهای جهانی، همچنین خطرات آفاتوکسین برای سلامتی انسان، به طور قطع تلاش مضاعف جهت تأمین بهداشت و ایمنی این ماده‌ی غذایی ضروری است و این امر، مستلزم ارتقای سطح استانداردهای ملی به استانداردهای توسعه یافته می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** آفاتوکسین، Enzyme-linked immunosorbent assay، گز

**ارجاع:** دهقانی سمیرا، سامی مسعود، میرلوحی مریم. بررسی آلودگی گزهای تولید شده در شهر اصفهان به باقی مانده آفاتوکسین. مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۱۶۷-۲۱۶۷

## مقدمه

تأمین سلامت مواد غذایی می‌تواند شرط لازم برای تأمین سلامت جامعه و یکی از شاخص‌های مهم توسعه باشد. بروز موارد متعدد بیماری‌های قابل انتقال از طریق مواد غذایی در جهان، لزوم توجه بیشتر به بهداشت مواد غذایی را بیش از پیش نمایان می‌سازد (۱-۲). از سوی دیگر، آمارهای موجود حاکی از آن است که سالانه هزاران تن مواد غذایی به علت غیر بهداشتی بودن، غیر قابل مصرف و معدوم می‌گردد و این مسأله، باعث زیان‌های اقتصادی کشورها می‌شود (۳).

قارچ‌ها قادر به تولید دامنه‌ی وسیعی از ترکیبات به نام متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. میکوتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات سمی هستند که اغلب توسط گونه‌های متعددی از جنس‌های قارچی

فوزاریوم، اسپرژیلوس و پی‌سیلیوم در مواد غذایی انسان و دام تولید می‌شوند (۴). آفاتوکسین از جمله این میکوتوکسین‌ها است و چهار نوع متداول آن در غذای انسان و خوراک دام با عناوین B1، B2، G1 و G2 شناسایی و طبقه‌بندی شده‌اند که در مجموع، به عنوان آفاتوکسین کل شناخته می‌شود و در بین آن‌ها B1 سمیت بیشتری دارد (۵-۷).

آفاتوکسین‌ها به دلیل پراکندگی جهانی و خطر آفرینی برای سلامت انسان‌ها در شمار میکوتوکسین‌هایی قرار دارند که در محصولات کشاورزی بیشترین مطالعه و آزمایش بر روی آن‌ها صورت گرفته است (۸). آلودگی آفاتوکسینی محصولات کشاورزی، یک نگرانی جهانی در ایمنی غذایی به شمار می‌رود. از آن جایی که آفاتوکسین‌ها به صورت بالقوه سرطان‌زا هستند، مقدار آن‌ها در غذای

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: masoud\_sami@nutr.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مسعود سامی

## روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۴۰ نمونه‌ی گز حاوی ۲۸ و ۴۰ درصد مغز پسته، تولید شده در شهر اصفهان با تاریخ تولید حداکثر دو هفته طی مدت یک سال از پاییز ۱۳۹۳ تا تابستان ۱۳۹۴ جمع‌آوری و از نظر وجود آفاتوکسین کل با روش ELISA آزمایش شدند. در این تحقیق، از کیت ELISA (Europroxima) ساخت کشور هلند به شماره‌ی ۵۱۲۱ استفاده شد.

بر اساس فرمول حجم نمونه، تعداد ۴۰ نمونه تعیین گردید که به صورت مساوی ۲۰ نمونه گز ۲۸ و ۲۰ نمونه گز ۴۰ درصد مغز پسته در نظر گرفته شد. نمونه‌ها به صورت دو تکرار در کیت ELISA مورد آزمون قرار گرفت

آماده‌سازی نمونه‌ها: طبق دستورالعمل ضمیمه شده در کیت ELISA، مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها و تعیین آفاتوکسین کل انجام گردید. جهت هموزن کردن نمونه‌ها، ابتدا ۲۵ گرم از هر نمونه به مدت ۲ ساعت در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس، در بوته‌ی چینی خرد گردید و به دستگاه آسیاب کن برقی منتقل و چند ثانیه به طور کامل هموزن شد. آن گاه، ۳ گرم از نمونه‌ی هموزن شده، وزن و به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۹ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد منتقل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد.

در ادامه، سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد و ۵۰ میکرولیتر از محلول شفاف فوقانی همراه با ۱۵۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده به ویال ۲ میلی‌لیتری منتقل و مخلوط گردید؛ پس از تهیه‌ی محلول‌های شستشو و محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف و انتقال آن‌ها به چاهک‌های مشخصی از کیت، ۵۰ میکرولیتر از محلول نهایی نیز به هر چاهک کیت اضافه شد.

در مرحله‌ی بعد، کژوگه و آنتی‌بادی نیز اضافه شد و به مدت یک ساعت به دور از نور و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. مایع موجود در چاهک‌ها تخلیه و همه‌ی چاهک‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر بافر مخصوص شسته شد (عمل شستشو ۳ بار تکرار گردید) و هر بار بعد از تخلیه‌ی مایع شستشو، میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار می‌گرفت تا به طور کامل باقی‌مانده‌ی آب شستشو خارج شود. به این ترتیب، موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده بودند، خارج شدند. سپس، محلول Substrate به چاهک‌ها اضافه شد و میکروپلیت در حرارت ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد.

در نهایت، برای توقف واکنش، محلول قطع واکنش به چاهک‌ها اضافه شد و میزان جذب هر نمونه با دستگاه خواننده‌ی میزان جذب ELISA در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده و اطلاعات مربوط به

انسان و دام در غالب کشورها به دقت مورد بازبینی و کنترل قرار می‌گیرد. به عنوان مثال، اتحادیه‌ی اروپا حداکثر ۸ نانوگرم/گرم را برای آفاتوکسین B1 و ۱۰ نانوگرم/گرم را برای آفاتوکسین کل در محصولات کشاورزی تعیین کرده است. طبق استاندارد ملی ایران، بیشینه‌ی رواداری آفاتوکسین کل در پسته‌ی مورد مصرف در تهیه‌ی گز ۱۵ نانوگرم/گرم می‌باشد (۹).

بر اساس قوانین JECFA و CODEX Alimentarius (Joint FAO/WHO expert committee on food additives) نیز حد مجاز آفاتوکسین کل ۱۵ نانوگرم/گرم است (۱۰). آفاتوکسین‌ها به دلیل اثرات مختلف بیوشیمیایی نظیر تأثیر بر روی متابولیسم انرژی، کربوهیدرات و چربی و اثر بر روی سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک و همچنین اثرات بیولوژیک، سرطان‌زایی، جهش‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، ایجاد مسمومیت کلیوی و کبدی و اثر تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (۱۱-۱۲).

ثابت شده است که آفاتوکسین با تشکیل یک گروه Epoxide در موجودات خون گرم، سمیت حاد و مزمن ایجاد می‌کند و حیواناتی که قادر به تولید آن نیستند، در مقابل بروز هر دو نوع سمیت به نسبت مقاوم می‌باشند. Epoxide آفاتوکسین B1، به صورت اختصاصی با دنباله‌های گوانین مولکول‌های DNA در تعدادی از نقاط فعال واکنش می‌دهد که یکی از نقاط کدون ۲۴۹ در ژن p53 می‌باشد. محصول این ژن در فرایندی که به طور طبیعی موجب محافظت در برابر سرطان می‌شود، شرکت می‌نماید (۱۳).

قارچ‌های مولد آفاتوکسین با پراکندگی وسیعی در محصولات کشاورزی همچون غلات، علوفه‌ی خشک، انواع آجیل، میوه‌های خشک و نان خشک ظاهر می‌شوند (۱۴).

گز فراورده‌ای است که از عمل‌آوری آب، انواع شکر، گلوکز مایع، سفیده‌ی تخم مرغ و انواع مغزها مانند مغز پسته، مغز بادام، مغز فندق و بعضی مواد اختیاری به دست می‌آید و به صورت گزهای آردی، لقمه‌ای، سکه‌ای و برشی تولید و در بستری از آرد یا پوشش‌های مجاز خوراکی، بسته‌بندی و عرضه می‌شود (۹). این فراورده به لحاظ برخی ویژگی‌ها نظیر بافت، مزه و خواص غذایی و دارویی و نداشتن هیچ گونه مواد افزودنی‌های سنتتیک غیر طبیعی، در عرصه‌ی محصولات غذایی جهان، منحصر به فرد می‌باشد. بنا بر این، نیاز مبرمی از حیث سلامت و ایمنی آن احساس می‌شود.

تحقیقاتی در زمینه‌ی بررسی وضعیت آلودگی به مایکوتوکسین‌ها در شیرینی‌های سنتی در کشورهای مختلفی صورت گرفته است (۱۵-۱۷). این مطالعه با هدف بررسی آلودگی باقی‌مانده‌ی آفاتوکسین کل گزهای تولید شده در شهر اصفهان با استفاده از روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) انجام شد.

بازیابی آزمون ۹۲ درصد به دست آمد که جهت افزایش ضریب اطمینان محاسبات با ۹۰ درصد بازیابی گزارش گردید.

### بحث

امروزه کیفیت محصول در اقتصاد جهانی، یک موضوع همگانی شده است و رقابت پویایی را در بسیاری از صنایع شکل می‌دهد؛ مقوله‌ی کیفیت، نه یک مزیت بلکه یک ضرورت برای تداوم کسب و کار است. از سوی دیگر، ارتقای کیفیت در پرتو برنامه‌ریزی حاصل می‌شود و ابزار کنترل و ارزیابی، وجود استانداردها و معیارهای از پیش تعیین شده است و در حقیقت، استاندارد کردن به هر مفهومی که باشد، در درجه‌ی اول کیفیت را در ذهن تداعی می‌کند (۹).

در بسیاری از کشورهای توسعه یافته‌ی جهان به منظور کنترل کیفیت بهداشتی مواد غذایی و فرآورده‌های غذایی، در کارخانه‌ها، کارگاه‌های تولیدی مواد غذایی و فروشگاه‌های مواد غذایی، استانداردهای ویژه‌ای در نظر گرفته می‌شود (۲۰-۱۹).

طبق استاندارد ملی ایران به شماره‌ی ۳۰۲۳ تجدید نظر دوم در سال ۱۳۹۳ مربوط به گز، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون، ویژگی مغزهای مورد مصرف در تهیه‌ی گز باید مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره‌ی ۱۹۲۵ باشد که با توجه به این استاندارد، بیشینه‌ی رواداری آفاتوکسین B1 برابر ۵ و آفاتوکسین کلی مساوی ۱۵ نانوگرم/گرم در پسته‌ی مورد استفاده در تهیه‌ی گز می‌باشد (۹)؛ اما در مورد حد مجاز مایکوتوکسین در گز، در حال حاضر استاندارد وجود ندارد.

در ایران و برخی کشورهای جهان تحقیقاتی در این زمینه صورت گرفته است. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به مطالعه‌ی جهانمرد و همکاران اشاره کرد. در این تحقیق، میزان آفاتوکسین کل (G1، B2، B1 و G2) در مغز پسته‌های تشکیل دهنده‌ی گز در ۱۱۲ نمونه از مغز پسته‌های به کار رفته در گز طی سال‌های ۱۲-۲۰۰۷ در اصفهان مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از وجود ۱۳/۴ درصد آلودگی آفاتوکسین B1 و ۹/۸ درصد آلودگی کل آفاتوکسین‌ها (آفاتوکسین کلی) بیش از حد مجاز تعیین شده در ایران از ۱۱۲ نمونه‌ی مورد بررسی بود (۱۷).

در آدانای ترکیه نیز طی تحقیقی که توسط Var و همکاران انجام شد، میزان آفاتوکسین B1 در غذای سستی ترکیه به نام جِلوا که در وعده‌ی صبحانه صرف می‌شود و از ترکیباتی مانند شکر، روغن کنجد، دانه‌ی کنجد بو داده، اسید سیتریک و یا اسید تارتاریک و کاکائو و مغز پسته در تهیه‌ی آن استفاده می‌شود، بررسی شد. در این تحقیق که بر روی ۱۰۲ نمونه شامل ۳۴ حلوای ساده، ۳۴ حلوای حاوی کاکائو و ۳۴ حلوای حاوی پسته انجام شد، در نمونه‌های ساده و نمونه‌های حاوی کاکائو آفاتوکسینی گزارش نشد، اما در ۸ نمونه از حلوای حاوی پسته، وجود آفاتوکسین تأیید شد که در ۴ مورد، از حد مجاز تعیین شده در ترکیه که

میزان جذب (OD یا Optical density) هر حفره به تفکیک ثبت شد. با وارد کردن مقدار جذب در نرم‌افزار کیت، منحنی کالیبراسیون رسم شد و به دنبال آن، بر اساس درصد جذب هر نمونه و انطباق با منحنی کالیبراسیون، میزان آفاتوکسین کلی در هر نمونه با واحد نانوگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (۱۸).

دقت و اعتبارسنجی آزمون: جهت بیان درجه‌ی دقت و اعتبارسنجی کیت ELISA، درصد بازیابی محاسبه شد. از یک نمونه‌ی مشخص گز استفاده گردید و ۳ چاهک کیت به آن اختصاص یافت. در چاهک اول، فقط نمونه‌ی آماده شده طبق روش پیش گفته تزریق شد، اما چاهک‌های دوم و سوم علاوه بر نمونه، حاوی مقدار مشخصی از یکی از استانداردهای آفاتوکسین موجود در کیت نیز بودند. در واقع، به دو لوله‌ی فالفون حاوی ۹ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد، ۳ گرم از نمونه‌ی مشخص اضافه شد و سپس به هر کدام از این دو لوله، مقدار مشخصی از محلول استاندارد آفاتوکسین با غلظت مشخص اضافه گردید. پس از انجام بقیه‌ی مراحل آماده‌سازی و استخراج، در نهایت محلول‌ها به چاهک‌های دوم و سوم منتقل و میزان جذب خوانده شد. میانگین حاصل از جذب چاهک‌های دوم و سوم به دست آمد و اختلاف آن با چاهک اول که فقط حاوی نمونه بود، محاسبه شد و در نهایت درصد بازیابی مشخص گردید (۱۸).

ارتباط بین میزان آفاتوکسین نمونه‌ها و درصد مغز پسته‌ی موجود در گزها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) بررسی شد.

### یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر، میزان آفاتوکسین کلی در گزهای تولیدی شهر اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی، ۳۹ نمونه از ۴۰ نمونه‌ی مورد آزمایش (۹۷/۵ درصد) دارای آلودگی بودند و میانگین میزان آفاتوکسین در کل نمونه‌ها، ۴/۱۱ نانوگرم/گرم با محدوده‌ی آلودگی ۱۳/۹۷ نانوگرم/گرم تا غیر قابل تشخیص بود. میانگین آلودگی در ۲۰ نمونه‌ی گز حاوی ۲۸ درصد مغز پسته  $۲/۴۹ \pm ۳/۵۳$  و در ۲۰ نمونه‌ی گز حاوی ۴۰ درصد مغز پسته  $۴/۴۰ \pm ۴/۷۰$  به دست آمد.

میزان آفاتوکسین کل در نمونه‌ها کمتر از حداکثر تعیین شده توسط سازمان ملی استاندارد ایران (۱۵ نانوگرم/گرم) بود، اما با توجه به استاندارد کشورهای اروپایی (۱۰ نانوگرم/گرم) میزان آفاتوکسین کل در ۴ نمونه (۱۰ درصد نمونه‌ها) بیش از حداکثر میزان تعیین شده و در ۳۶ نمونه (۹۰ درصد) کمتر از حداکثر میزان تعیین شده بود. میزان آفاتوکسین کلی در گزهای ۴۰ درصد مغز پسته بیشتر از گزهای ۲۸ درصد مغز پسته بود، اما آزمون Mann-Whitney اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $P = ۰/۸۲$ ).

به طور قطعی تلاش مضاعف جهت تأمین اصول بهداشتی و امنیت این ماده‌ی غذایی ضروری است. از طرفی، با توجه به حضور آفاتوکسین به عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌های سلامت، بررسی، نظارت و کنترل این مهم بیش از پیش احساس می‌شود که این امر، مستلزم ارتقای سطح استانداردهای ملی و تطابق آن با قوانین و استانداردهای کشورهای توسعه یافته می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد سمیرا دهقانی با شماره‌ی طرح تحقیقاتی ۳۹۴۱۱۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل حمایت‌های مالی کمال تشکر و سپاس را دارند.

۵ میکروگرم بر کیلوگرم بود، بیشتر بود (۱۵). در مالزی نیز ۱۲/۵ درصد از شیرینی‌های حاوی بادام زمینی، آلوده به آفاتوکسین کلی بود (۱۶). با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، اگر چه میزان آلودگی کمتر از حداکثر تعیین شده توسط سازمان ملی استاندارد ایران (۱۵ نانوگرم/گرم) بود، اما بر اساس استاندارد کشورهای اروپایی (۱۰ نانوگرم/گرم) ۱۰ درصد نمونه‌ها به طور کلی بیش از حد مجاز آلوده بودند.

از طرفی، بیشترین میزان آلودگی ۱۳/۹۷ نانوگرم/گرم مشخص شد که اختلاف کمی با حداکثر میزان مجاز استاندارد ملی دارد. گز، یکی از فراورده‌های غذایی سنتی ایران با ویژگی‌های منحصر به فرد می‌باشد. به دلیل اهمیت این موضوع و بعد اقتصادی آن به خصوص بحث صادرات آن به کشورهای مختلف و ورود به بازارهای جهانی،

### References

- World Health Organization. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva, Switzerland: WHO; 2008.
- World Health Organization. Foodborne disease: a focus for health education. Geneva, Switzerland: WHO; 2000.
- National Restaurant Association Economic Forecast (NRA). Increased restaurant industry sales, employment growth predicted. [Online]. [cited 2007]; Available from: URL: <http://www.katc.com/story/58029971>
- Mortazavi A, Tabatabaei F. Fungal mycotoxins. 1<sup>st</sup> ed. Mashhad, Iran: Ferdowsi Mashhad University Publication; 1997. p. 14-25. [In Persian].
- Heshmati A, Milani JM. Contamination of UHT milk by aflatoxin M in Iran. Food Control 2010; 21(1): 19-22.
- Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. Food Control 2005; 16(7): 593-9.
- World Health Organization (WHO), International Agency For Research On Cancer (IARC). Aflatoxins. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: WHO, IARC: 1993. vol. 56. p. 245-395.
- Sinha KK, Bhatnagar D. Mycotoxin in agriculture and food safety. New York, NY: Dekker; 1988. p. 3-23.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). Gaz –specification and test methods (St No: 3023. 2<sup>nd</sup>. Revision). Tehran, Iran: ISIRI; 2014. [In Persian].
- Codex Alimentarius. Codex General Standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex Standard (193-1995) 2010. [Online]. [cited 2011 Apr 4]; Available from: URL: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/CXS\\_193e.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/CXS_193e.pdf)
- Sweeney MJ, Pamies P, Dobson AD. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. Int J Food Microbiol 2000; 56(1): 97-103.
- Mahmoudi R, Norian R, Katirae F, Pajohi-Alamoti MR, Emami SJ. Occurrence of aflatoxin B1 in pistachio nuts during various preparing processes: tracing from Iran. Journal of Mycology Research 2014; 1(1): 1-5.
- Moradi M, Massomi H. Study of pistachio nut contamination to aflatoxin in pre-harvest and processing by using ELISA. Report of IPRI 1998: 13. [In Persian].
- Zinedine A, Gonzalez-Osnaya L, Soriano JM, Molto JC, Idrissi L, Manes J. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. Int J Food Microbiol 2007; 114(1): 25-9.
- Var I, Kabak B, Gok F. Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC. Food Control 2007; 18(1): 59-62.
- Leong YH, Ismail N, Latif AA, Ahmad R. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. Food Control 2010; 21(3): 334-8.
- Jahanmard E, Azarani F, Sharifi M, Esfandiari Z. Aflatoxin in pistachio nuts used as ingredients in Gaz sweets produced in Isfahan, Iran. Food Addit Contam Part B Surveill 2014; 7(1): 70-3.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). Cereals and dried fruits - determination of aflatoxins B and G groups by elisa method - test method (No: 5925. 1<sup>st</sup> Revision). Tehran, Iran: ISIRI; 2014. [In Persian].
- Food Standards Australia New Zealand (FSAN). Food Safety Programs. [Online]. [cited 1 Sep 2007]; Available from: URL: [www.foodstandards.gov.au/industry/safetystandards/Documents/Guide%20321%20FINAL.doc](http://www.foodstandards.gov.au/industry/safetystandards/Documents/Guide%20321%20FINAL.doc)
- Food Safety and Inspection Service (FSIS), United States Department of Agriculture. Risk assessments. [Online]. [cited 2010]; Available from: [www.fsis.usda.gov](http://www.fsis.usda.gov)

## The Contamination of "Gaz" to Aflatoxin Residue in Isfahan City, Iran

Samira Dehghani<sup>1</sup>, Masoud Sami PhD<sup>2</sup>, Maryam Mirlohi PhD<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Aflatoxins are toxic and carcinogenic secondary metabolites usually produced by certain strains of the fungi such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and rarely *Aspergillus nomius*. In appropriate temperature and humidity, these fungi are able to contaminate agricultural commodities and then produce aflatoxins. This study aimed to determine the total aflatoxin level in "Gaz" produced in Isfahan city, Iran.

**Methods:** 40 Gaz samples containing 28% and 40% pistachio nuts were prepared from production units in Isfahan city and the total aflatoxin level was evaluated via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Findings:** 39 samples (97.5%) were contaminated with the mean aflatoxin level of  $4.11 \pm 3.55$  ng/g. The total aflatoxin level in 40 samples was between non-detected and 13.97 ng/g. The mean aflatoxin level was  $3.53 \pm 2.49$  and  $4.70 \pm 4.40$  ng/g in samples containing 28% and 40% pistachio, respectively, with no significant difference between the two groups ( $P = 0.82$ ). The mean aflatoxin level was found to be lower than the maximum tolerance limit (15 ng/g) determined by the Iranian National Standards Organization but in 4 samples (10% of samples) higher than the maximum tolerance limit (10 ng/g) accepted by the European countries.

**Conclusion:** According to the Gaz economic importance, especially exporting to the world markets, as well as dangers of aflatoxin for human health and considering it as one of the most important health indicators, definitely an extra effort is needed to warranty the hygiene and safety of this product. In addition, national standard should be promoted to the level of developed countries.

**Keywords:** Gaz; Aflatoxin; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

**Citation:** Dehghani S, Sami M, Mirlohi M. The Contamination of "Gaz" to Aflatoxin Residue in Isfahan City, Iran. J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2167-71

1- MSc Student, Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Science AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Food Security Research Center AND Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Food Security Research Center AND Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Science, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Masoud Sami, Email: masoud\_sami@nutr.mui.ac.ir

## بررسی ارزش تشخیصی نقطه‌ی طب سوزنی Lanwei جهت تشخیص آپاندیسیت حاد

دکتر مهران رضوانی<sup>۱</sup>، هلیا عمیدی<sup>۲</sup>، دکتر سید مرتضی حیدری<sup>۱</sup>، دکتر سید علیرضا حسینی<sup>۳</sup>، دکتر رضا اشراقی سامانی<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** آپاندیسیت، شایع‌ترین علت شکم حاد است و از آن جهت که تشخیص آپاندیسیت اغلب سخت است، شیوع لاپاراتومی منفی را افزایش می‌دهد. از این رو، یافتن روش بالینی جهت تشخیص آپاندیسیت با حساسیت بالا، امری ضروری به نظر می‌رسد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی ارزش تشخیصی نقطه‌ی طب سوزنی Lanwei جهت تشخیص آپاندیسیت حاد بود.

**روش‌ها:** این مطالعه بر روی ۱۵۰ بیمار مشکوک به آپاندیسیت مراجعه کننده به بیمارستان‌های الزهرا (س) و آیت‌اله کاشانی اصفهان انجام گرفت. بیماران از لحاظ وجود آپاندیسیت تحت معاینه با استفاده از دو آزمون Lanwei و Mcburney قرار گرفتند و سپس نتایج در پرسش‌نامه ثبت شد. بیماران به اتاق عمل فرستاده شدند و آپاندیس آنان جهت پاتولوژی ارسال گردید. در آخر، نتایج مثبت آپاندیسیت بر حسب پاتولوژی با آزمون‌های Lanwei و Mcburney با استفاده از آزمون‌های  $\chi^2$  و One-way ANOVA مقایسه شد.

**یافته‌ها:** آزمون Lanwei دارای حساسیت ۲۲/۶ و ویژگی ۲۳/۵ درصد بود. درصد مثبت و منفی کاذب این آزمون به ترتیب ۷۷/۴ و ۷۶/۵ درصد و میزان صحت این آزمون، معادل ۲۲/۷ درصد بود. آزمون Mcburney دارای حساسیت ۹۵/۵ و ویژگی صفر درصد بود. درصد مثبت و منفی کاذب به ترتیب ۱۰۰ و ۴/۵ درصد بود و میزان صحت آزمون Mcburney معادل ۸۴/۷ درصد به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** آزمون Lanwei دارای توافق بالایی با نتایج پاتولوژی نیست و همچنین توافق بالایی با دیگر معیارهای بالینی تشخیصی آپاندیسیت از جمله آزمون Mcburney ندارد.

**واژگان کلیدی:** آپاندیسیت، Lanwei، Mcburney

**ارجاع:** رضوانی مهران، هلیا عمیدی، حیدری سید مرتضی، حسینی سید علیرضا، اشراقی سامانی رضا. بررسی ارزش تشخیصی نقطه‌ی طب سوزنی

Lanwei جهت تشخیص آپاندیسیت حاد. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۱۷۸-۲۱۷۲

## مقدمه

آپاندیسیت، شایع‌ترین علت شکم حاد است و عمل آپاندکتومی که به دنبال آپاندیسیت انجام می‌شود، شایع‌ترین عمل جراحی اورژانس در دنیا می‌باشد. از آن جهت که تشخیص آپاندیسیت اغلب سخت است، شیوع لاپاراتومی منفی را بالا می‌برد. احتمال اشتباه در تشخیص در زنان خیلی بیشتر از مردان است. بیشترین میزان آپاندکتومی منفی در زنان بالای ۸۰ سال گزارش شده است. در مقایسه با بیماران جوان، بیماران مسن مبتلا به آپاندیسیت، مشکل تشخیصی بیشتری دارند؛ چرا که هم تظاهر غیر طبیعی است، هم تشخیص‌های افتراقی بیشتری مطرح است و هم برقراری ارتباط با آن‌ها مشکل‌تر است. این عوامل،

باعث می‌شود تا میزان پرفوراسیون آپاندیسیت در این گروه بیشتر باشد (۱).

تظاهرات بالینی آپاندیسیت شامل درد شکم است که از پایین اپی‌گاستر و زیر ناف شروع می‌شود و ۴-۶ ساعت بعد به RLQ (Right lower quadrant) تغییر می‌یابد. گفته می‌شود بیشترین شدت درد در نقطه‌ی McBurney است. از تظاهرات دیگر، بی‌اشتهایی است که به طور تقریبی همیشه وجود دارد. تهوع و استفراغ از علائم دیگر است که به دنبال بی‌اشتهایی و درد بروز می‌یابد.

معاینه‌ی فیزیکی، نقش مهمی در تشخیص زودرس و مدیریت شرایط ایفا می‌کند. آن چه کمک کننده است، Tenderness در RLQ.

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

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

۳- استادیار، گروه جراحی عمومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران



با وجود آپاندیسیت ندارند (۷)، اما از آن جهت که این مطالعه روی تعداد محدودی (۵۰ نفر) از افراد با علائم آپاندیسیت انجام شده است، از جهت آماری ارزش کافی برای این فرضیه را ندارد. نقطه‌ی Lanwei از آن جهت که خارج از محدوده‌ی شکم قرار دارد و در تشخیص‌های افتراقی آپاندیسیت هم مثبت نمی‌شود، آزمون مناسبی برای تشخیص آپاندیسیت به نظر می‌رسد. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی میزان حساسیت و اختصاصیت نقطه‌ی Lanwei جهت جایگزینی به جای نقطه‌ی Mcburney و یا کمک به معیارهای Alvarado در تشخیص آپاندیسیت حاد انجام شد.

### روش‌ها

این مطالعه، یک پژوهش توصیفی-تحلیلی بود که در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ در بیمارستان‌های آموزشی الزهرا (س) و آیت‌اله کاشانی اصفهان انجام شد. جامعه‌ی مورد مطالعه، بیماران مراجعه کننده با علائم آپاندیسیت به این مراکز بودند.

وجود علائم درد شکم با انتشار به RLQ و پیشرفت درد و مشکوک به آپاندیسیت که بر حسب تشخیص جراح و آزمایش‌های سرولوژی بیمار، آپاندیسیت حاد باشد و عدم دریافت مسکن، به عنوان معیارهای ورود به مطالعه در نظر گرفته شد. همچنین، عدم امکان انجام معاینات و تعیین نتایج آزمون به علل مختلف به عنوان معیارهای خروج از مطالعه منظور گردید.

حجم نمونه‌ی مورد نیاز مطالعه با استفاده از فرمول برآورد حجم نمونه جهت مطالعات شیوع و در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد،  $(Z_{1-\alpha/2} = 1/96)$ ، شیوع موارد مثبت آزمون Lanwei که به علت نبودن مطالعه‌ی مشابه به میزان ۰/۵ در نظر گرفته شد و همچنین، میزان خطای ۰/۱، به تعداد ۹۶ بیمار برآورد شد که جهت اطمینان بیشتر ۱۵۰ بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند.

روند کار بدین صورت بود که بعد از تصویب پیش‌نویس طرح تحقیقاتی و اخذ مجوزهای لازم، هر بیماری که در اورژانس بیمارستان‌های الزهرا (س) و آیت‌اله کاشانی اصفهان با تشخیص شکم حاد بستری می‌شد، مورد آزمایش Lanwei قرار می‌گرفت. به این صورت که محکم (Firmly) با انگشت شست، چند نقطه‌ی طب سوزنی در هر پا را فشار داده و از بیمار سؤال می‌شد که «آیا هیچ کدام از نقاط، دردناک‌تر از نقاط دیگر بوده است یا خیر؟». اگر بیمار حساسیت خاصی را در یک ناحیه احساس می‌کرد، آزمون به طور سریع دوباره تکرار و از بیمار سؤال می‌شد که «آیا ادامه‌ی درد در همان نقطه وجود دارد یا نه؟». علامت Lanwei مثبت زمانی در نظر گرفته می‌شد که حساسیت در یک نقطه توسط بیمار روی یک پا هر دو پا به صورت بسیار برجسته مشخص شود.

Rebound tenderness، علامت (Indirect rebound) Rousing، Obturator sign و Psoas sign است (۲). از جمله نتایج آزمایشگاهی کمک کننده CBC (Complete blood count) است که لکوسیتوز بین ۱۰/۰۰۰ تا ۱۸/۰۰۰ سلول در میلی‌متر مکعب با غلبه‌ی پلی‌مورفونوکلتر وجود دارد (۱). بر اساس مطالعات مختلف و با توجه به سخت بودن تشخیص آپاندیسیت، جهت تشخیص زودرس از سیستم امتیازدهی Alvarado استفاده می‌شود.

بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که طب سوزنی در تشخیص و درمان بیماری‌های دستگاه گوارش از جمله بیماری‌های عملکردی روده مثل IBS (Irritable bowel syndrome)، اسهال، یبوست، بیماری‌های التهابی روده و دردهای مربوط به پانکراتیت مورد استفاده واقع می‌شود (۳). نقطه‌ی Lanwei یک منطقه‌ی طب سوزنی در قسمت جلویی کناری (Anterolateral) کرست تیبیا، ۴ انگشت زیر لبه‌ی کناری-تحتانی Patella است. بر اساس منابع چینی، این نقطه در درمان آپاندیسیت حاد بسیار استفاده شده است (۴). در بسیاری از منابع طب سنتی چینی آمده است که نقطه‌ی Lanwei در بیماران با آپاندیسیت حاد، حساس (Tender) می‌شود (۴-۵).

Lanwei در زبان چینی به معنای «آپاندیس کرمی شکل» است. نقطه‌ی Lanwei به عنوان یک نقطه‌ی هشدار (Alarm point) در نظر گرفته می‌شود. نقاط طب سوزنی هنگامی در لمس، دردناک (Tender) می‌شوند که یک بیماری در ارتباط با اندام مربوط به آن نقطه وجود داشته باشد. نقاط هشدار در تشخیص و درمان بیماری‌ها مفید هستند (۵).

به دلیل موقعیت آپاندیس، بیماری‌های دیگری هم قادرند علائم آپاندیسیت را تقلید کنند (۷)؛ از این میان می‌توان لنگدانیت مزانتریک حاد، بیماری التهابی حاد لگنی، کیست‌های تخمدانی یا فولیکول گراف پاره، گاستروانتریت حاد و وضعیت بالینی بدون پاتولوژی ارگانیک را نام برد (۱).

نقطه‌ی Mcburney منطقه‌ای در شکم است که می‌تواند به دلایل غیر آپاندیسیت هم حساس شود یا حتی به دلیل قرار نگرفتن آپاندیس در محل معمول خود می‌تواند به طور کاذب منفی شود. Sleisenger و Fordtran توضیح دادند که ارتباط متناقضی بین نقطه‌ی Mcburney و آپاندیس ملتهب شده‌ی نوع Underlying وجود دارد و در این حالت، بیشترین حساسیت دورتر از مکان آناتومیک آپاندیس است (۶).

بر اساس مطالعه‌ی Levy و Texidor روی نقطه‌ی Lanwei مشخص شد که عدم حساسیت در این نقطه، شاخصی برای عدم وجود آپاندیسیت حاد در بیماران مورد مطالعه نیست. بر اساس نتایج این مطالعه هیچ یک از نقاط Lanwei و Mcburney ارتباط پایداری



اپی‌گاستر، ۲۳ نفر (۱۵/۳ درصد) در RLQ و ۵۹ نفر (۳۹/۳ درصد) در ناحیه‌ی دور ناف بود. درد در ۱۳۰ بیمار (۸۶/۷ درصد) به ناحیه‌ی RLQ انتشار می‌یافت.

در جدول ۱، توزیع فراوانی علائم بالینی بیماران تحت مطالعه آمده است. بر حسب این جدول، شایع‌ترین علائم مشاهده شده در بیماران، وجود تهوع و بی‌اشتهایی است و در ۹۶ درصد بیماران، در ناحیه‌ی RLQ حساسیت وجود داشت.

جدول ۱. توزیع فراوانی علائم بالینی بیماران تحت مطالعه

علائم	تعداد (درصد)
تهوع	۱۰۳ (۶۸/۷)
استفراغ	۹۳ (۶۲/۰)
بی‌اشتهایی	۱۱۹ (۷۹/۳)
وجود درد	۵۰ (۳۳/۳)
اسهال	۹ (۶/۰)
یبوست	۱۵ (۱۰/۰)
وجود حساسیت در RLQ	۱۴۴ (۹۶/۰)
وجود Rebound tenderness	۱۲۴ (۸۲/۷)
علامت Psoas	۱۱ (۷/۳)
علامت Obturator	۱۰ (۶/۷)
علامت Rousing	۵ (۳/۳)

RLQ: Right lower quadrant

بر حسب نتایج پاتولوژی، از ۱۵۰ بیمار مطالعه شده، ۱۳۳ نفر (۸۸/۷ درصد) مبتلا به آپاندیسیت بودند و نتیجه‌ی آپاندیس در ۱۷ بیمار (۱۱/۳ درصد) طبیعی گزارش شده بود. از نظر نوع آپاندیسیت، شایع‌ترین نوع مشاهده شده، آپاندیسیت چرکی با فراوانی ۸۴ مورد (۵۶ درصد) بود (شکل ۱).

در جدول ۲، توزیع یافته‌های آزمایشگاهی بیماران مورد مطالعه آمده است.

نقطه‌ی Lanwei یک منطقه‌ی طب سوزنی در قسمت جلویی کناری (Anterolateral) کرست تیبا، ۴ انگشت زیر لبه‌ی کناری-تحتانی Patella است. همچنین، اگر ناف را به ASIS وصل کنیم، بین ثلث میانی و خارجی این خط، نقطه‌ی Mcburney خواهد بود. در مرحله‌ی بعد، بیمار توسط جراحان از نظر آپاندیسیت معاینه و معیارهای Alvarado توسط آن‌ها چک می‌شد و نتایج در فرم جمع‌آوری اطلاعات، ثبت می‌گردید.

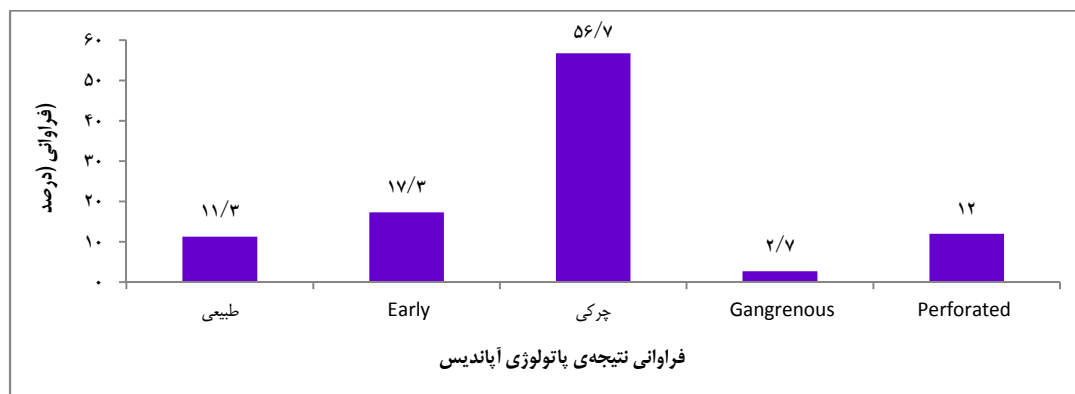
سیستم امتیازدهی Alvarado شامل ۳ قسمت Symptom (مهاجرت درد، بی‌اشتهایی، تهوع و استفراغ هر کدام ۱ امتیاز)، Sign (حساسیت RLQ ۲ امتیاز، حساسیت برگشتی ۱ امتیاز، تب ۱ امتیاز) و Laboratory [لکوسیتوز ۲ امتیاز، تمایل به چپ (افزایش نوتروفیل) ۱ امتیاز] می‌باشد. اگر جمع امتیازات بیمار ۱۰-۹ باشد، به طور قطعی جراحی لازم است؛ اگر ۸-۷ باشد، Computed tomography scan (CT scan) یا Observation لازم است؛ اگر ۶-۵ باشد، CT scan و اگر ۴-۰ باشد، Observation نیاز دارد. پس از آپاندکتومی، نتیجه‌ی پاتولوژی با نتایج حاصل از آزمون‌ها مقایسه شد.

داده‌های مطالعه پس از جمع‌آوری، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version 23, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آماری  $\chi^2$ ، t، و One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۵۰ بیمار مراجعه کننده با شکم حاد با میانگین سنی  $29/11 \pm 15/00$  سال (دامنه‌ی ۸۱-۱۰ سال) مورد مطالعه قرار گرفتند که ۱۰۴ نفر آن‌ها (۶۹/۳ درصد) مرد و ۴۶ نفر (۳۰/۷ درصد) زن بودند. ۱۴ نفر (۹/۳ درصد) از این بیماران دارای سابقه‌ی قبلی عمل جراحی بودند.

محل اولیه‌ی درد شکم در ۶۸ نفر (۴۵/۳ درصد) در ناحیه‌ی



شکل ۱. درصد فراوانی نتیجه‌ی پاتولوژی آپاندیس در بیماران تحت مطالعه

جدول ۲. توزیع یافته‌های آزمایشگاهی در بیماران تحت مطالعه

متغیر	سطح متغیر	میانگین	انحراف معیار
درجه‌ی حرارت		۳۷/۵۴	۱/۶۸
Complete blood count (CBC)	تعداد گلبول سفید	۱۶۱۳۶/۲۷	۲۵۳/۵۹
	درصد نوتروفیل	۷۹/۷۴	۱۰/۰۰
	درصد لنفوسیت	۱۲/۴۳	۶/۲۶
آنالیز ادرار	گلبول سفید	تعداد	درصد
		۰-۱	۷۸/۷
		۱-۲	۸/۷
		۸-۱۰	۶
		۱۰-۱۵	۲/۷
		فراوان	۴
	گلبول قرمز	۰-۱	۱۰/۷
		۱-۲	۱۰/۷
		۲-۳	۳/۳
		۳-۴	۳/۳
		۴-۶	۳/۳
		۱۰-۱۸	۲/۷
سلول اپی تلیال	۰	۹۰/۷	
	۰-۱	۲/۷	
	۱-۲	۳/۳	
	۶-۸	۳/۳	
	۰	۱۰۰	
	۱۵۰		

ارزش اخباری مثبت و منفی آن به ترتیب ۶۹/۸ و ۳/۷ درصد و میزان صحت آن معادل ۲۲/۷ درصد به دست آمد.

بر حسب جدول ۳، در بیماران مبتلا به آپاندیسیت حاد، میزان توافق آزمون Lanwei با نتیجه‌ی پاتولوژی از نظر آماری معنی‌دار، اما مقدار توافق در حد ضعیف (۱۵ درصد) بود. همچنین، توافق این آزمون با وجود حساسیت در قسمت RLQ نیز معنی‌دار و میزان آن در حد متوسط (۵۹ درصد) بود. از دیگر متغیرها، توافق بین Lanwei و بی‌اشتهایی (۱۰ درصد)، الکوسیتوز (۲۵ درصد) و افزایش درصد نوتروفیل (۱۵ درصد) معنی‌دار، اما مقدار توافق در حد ضعیف بود.

### بحث

آپاندیسیت یک بیماری شایع در تمامی دنیا است که جهت تشخیص این عارضه، از روش‌های مختلف بالینی و آزمایشگاهی استفاده می‌گردد. روش‌های بالینی مورد استفاده در تشخیص آپاندیسیت اغلب شامل وجود درد در قسمت RLQ، تب، لکوسیتوز و وجود حساسیت در محل RLQ می‌باشد، اما هیچ یک از این معیارها، به طور کامل

نتیجه‌ی آزمون Mcburney در ۱۴۴ نفر (۹۶ درصد) و نتیجه‌ی آزمون Lanwei در ۴۳ نفر (۲۸/۷ درصد) مثبت بود. در بررسی نتیجه‌ی این دو آزمون بر حسب نتیجه‌ی پاتولوژی، هر ۱۷ مورد پاتولوژی منفی (۱۰۰ درصد)، در آزمون Mcburney مثبت بودند، در حالی که از ۱۳۳ مورد پاتولوژی مثبت، آزمون Mcburney در ۶ نفر (۴/۵ درصد) مثبت بود. از طرف دیگر، از ۱۷ مورد پاتولوژی منفی، نتیجه‌ی آزمون Lanwei در ۱۳ نفر (۷۶/۵ درصد) مثبت و در ۴ نفر (۲۳/۵ درصد) منفی بود. همچنین، از ۱۳۳ مورد پاتولوژی مثبت، نتیجه‌ی آزمون Lanwei در ۱۰۳ نفر (۷۷/۴ درصد) منفی بود.

بر حسب نتایج به دست آمده، آزمون Mcburney دارای حساسیت ۹۵/۵ و ویژگی صفر درصد بود. درصد مثبت و منفی کاذب به ترتیب ۱۰۰ و ۴/۵ درصد بود. همچنین، ارزش اخباری مثبت و منفی این آزمون به ترتیب ۸۸/۲ و صفر درصد و میزان صحت آن معادل ۸۴/۷ درصد به دست آمد.

آزمون Lanwei دارای حساسیت ۲۲/۶ و ویژگی ۲۳/۵ درصد بود. موارد مثبت و منفی کاذب این آزمون به ترتیب ۷۷/۴ و ۷۶/۵ درصد،

جدول ۳. میزان توافق آزمون Lanwei با سایر یافته‌ها در بیماران مبتلا به آپاندیسیت حاد

مقدار P	مقدار توافق (درصد)	مثبت	منفی	Lanwei	آزمون‌ها
< ۰/۰۰۱	۱۶/۰	۱۳ (۳۰/۲)	۴ (۳/۷)	منفی	پاتولوژی
		۳۰ (۶۹/۸)	۱۰۳ (۹۶/۳)	مثبت	
۰/۱۱۰	۳/۰	۰ (۰)	۶ (۵/۶)	منفی	Mcburney
		۴۳ (۱۰۰)	۱۰۱ (۹۴/۴)	مثبت	
۰/۱۰۰	۲/۵	۴ (۹/۳)	۲۲ (۲۰/۶)	منفی	حساسیت برگشتی
		۳۹ (۹۰/۷)	۸۵ (۷۹/۴)	مثبت	
۰/۰۸۰	۱۱/۰	۲۳ (۲۳۱۰/۳)	۴۱ (۳۸/۳)	خیر	وجود تب
		۳۳ (۷۶/۷)	۶۶ (۶۱/۷)	بلی	
< ۰/۰۰۱	۵۹/۰	۰ (۰)	۶ (۵/۶)	منفی	حساسیت
		۴۳ (۱۰۰)	۱۰۱ (۹۴/۴)	مثبت	
۰/۷۰۰	۰/۵	۵ (۱۱/۶)	۱۵ (۱۴/۰)	خیر	مهاجرت درد به RLQ
		۳۸ (۸۸/۴)	۹۲ (۸۶/۰)	بلی	
۰/۰۲۹	۱۰/۰	۴ (۹/۳)	۲۷ (۲۵/۲)	خیر	بی‌اشتهایی
		۳۹ (۹۰/۷)	۸۰ (۷۴/۸)	بلی	
۰/۸۵۰	۱/۰	۱۳ (۳۰/۲)	۳۴ (۳۱/۸)	خیر	تهوع
		۳۰ (۶۹/۸)	۷۳ (۶۸/۲)	بلی	
۰/۸۱۰	۲/۰	۱۷ (۳۹/۵)	۴۰ (۳۷/۴)	خیر	استفراغ
		۲۶ (۶۰/۵)	۶۷ (۶۲/۶)	بلی	
< ۰/۰۰۱	۲۵/۰	۲۹ (۶۷/۴)	۳۸ (۳۵/۵)	خیر	لکوسیتوز
		۱۴ (۳۲/۶)	۶۹ (۶۴/۵)	بلی	
۰/۰۰۵	۰/۱۵	۱۸ (۴۱/۹)	۲۱ (۱۹/۶)	خیر	افزایش نوتروفیل
		۲۵ (۵۸/۱)	۸۶ (۸۰/۴)	بلی	

RLQ: Right lower quadrant

Alvarado در تشخیص آپاندیسیت حاد به انجام رسید. در این مطالعه، ۱۵۰ بیمار مراجعه کننده با شکم حاد مورد مطالعه قرار گرفتند که نتایج حاصل از پاتولوژی در ۱۱/۳ درصد بیماران منفی بود. از طرف دیگر، نتیجه‌ی آزمون Lanwei در ۷۱/۳ درصد بیماران منفی بود و میزان توافق این آزمون با نتیجه‌ی پاتولوژی در حد ضعیف (۱۶ درصد) بود. ضمن این که نتایج این آزمون با دیگر شاخص‌ها و معیارهای بالینی آپاندیسیت نیز توافق بالایی نداشت. بر اساس مطالعه‌ی Levy و Texidor روی نقطه‌ی Lanwei، مشخص شد که عدم حساسیت در این نقطه، شاخصی برای عدم وجود آپاندیسیت حاد در بیماران مورد مطالعه نیست. بر اساس نتایج این مطالعه هیچ یک از نقاط Mcburney و Lanwei ارتباط پایداری با وجود آپاندیسیت ندارند (۷). در مطالعه‌ی Alt-Epping و همکاران، در بررسی ۶۵ بیمار مشکوک به آپاندیسیت حاد، آزمون Lanwei دارای حساسیت ۶۴/۴ و ویژگی ۵۰ درصد بود و در این مطالعه نیز از این آزمون به عنوان یک ابزار کمکی در تشخیص اولیه‌ی

مؤید تشخیص قطعی بیماری نیستند و تنها از طریق جراحی آپاندکتومی و ارسال نمونه به پاتولوژی، می‌توان به تشخیص قطعی دست یافت. در عین حال، با توجه به این که درصد قابل توجهی از بیماران مراجعه کننده با شکم حاد، مبتلا به آپاندیسیت نیستند، استفاده از روش‌های بالینی و آزمایشگاهی قبل از انجام عمل جراحی لازم و ضروری می‌باشد؛ در این ارتباط نیز تاکنون آزمون‌های مختلفی معرفی شده است که این آزمون‌ها دارای میزان حساسیت و ویژگی متفاوتی هستند، اما در عین حال، به علت غیر تهاجمی بودن و کمک به تشخیص، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

آزمون Lanwei یکی از آزمون‌های بالینی است که در طب سوزنی به عنوان یک معیار تشیعی در آپاندیسیت حاد معرفی شده است و از آن جایی که مطالعه‌ای جهت بررسی میزان توافق این آزمون با دیگر آزمون‌های بالینی آپاندیسیت و پاتولوژی در داخل کشور انجام نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین امکان استفاده از نقطه‌ی Lanwei به عنوان جایگزین یا کمک به معیارهای

نتایج پاتولوژی که استاندارد طلائی تشخیص آپاندیسیت محسوب می‌گردد، نیست. همچنین بر حسب نتایج این مطالعه، آزمون Lanwei دارای توافق بالایی با دیگر معیارهای بالینی تشخیصی آپاندیسیت از جمله آزمون Mcburney نیست و فقط به عنوان یک معیار بالینی کمکی در تشخیص اولیه‌ی آپاندیسیت حاد می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای هلیا عمیدی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بوده و با حمایت‌های معنوی و مادی حوزه‌ی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفته است. بدین وسیله از زحمات این عزیزان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

آپاندیسیت حاد نام برده شد (۸). این در حالی است که در مطالعه‌ی حاضر، آزمون Lanwei دارای حساسیت ۲۲/۶ و ویژگی ۲۳/۵ درصد بود که به مراتب کمتر از مطالعه‌ی Alt-Epping و همکاران می‌باشد و علت آن ممکن است ناشی از جمعیت متفاوت مورد مطالعه و فرد انجام دهنده باشد.

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Al-Ajerami انجام گرفت، در بررسی ۱۸۰ مورد مشکوک به آپاندیسیت حاد، آزمون Lanwei دارای حساسیت ۸۴/۸ و ویژگی ۸۳/۳ درصد بود (۹). در عین حال، مطالعات زیادی در مورد ارزش تشخیصی این آزمون انجام نشده است؛ هر چند که در طب سنتی چین، از این آزمون برای تشخیص آپاندیسیت استفاده می‌گردد.

نتیجه‌گیری نهایی این که آزمون Lanwei دارای توافق بالایی با

### References

1. Brunicaudi F, Andersen D, Billiar T, Dunn D, Hunter J, Matthews J, et al. Schwartz's principles of surgery. 9<sup>th</sup> ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2009. p. 1071-2, 1080.
2. Old JL, Dusing RW, Yap W, Dirks J. Imaging for suspected appendicitis. Am Fam Physician 2005; 71(1): 71-8.
3. Diehl DL. Acupuncture for gastrointestinal and hepatobiliary disorders. J Altern Complement Med 1999; 5(1): 27-45.
4. Bensky D, OConnor J. Acupuncture, a comprehensive text. Seattle, WA: Eastland Press; 1981. p. 40, 271, 639-40.
5. Jayasuriya A. Acupuncture Science. Colombo, Sri Lanka: Acupuncture Foundation of Sri Lanka; 1982.
6. Sleisenger MH, Fordtran JS. Gastrointestinal disease: pathophysiology, diagnosis, management. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1983. p. 247.
7. Levy JH, Texidor MS. The lack of importance of Lanwei point in the diagnosis of acute appendicitis. Pain 1988; 33(1): 79-80.
8. Alt-Epping S, Ostermann T, Schmidt J, Zirngibl H. Diagnosis of appendicitis with particular consideration of the acupuncture point Lanwei--a prospective study. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd 2002; 9(6): 338-45. [In German].
9. Al-Ajerami Y. Sensitivity and specificity of ultrasound in the diagnosis of acute appendicitis. East Mediterr Health J 2012; 18(1): 66-9.

## Diagnostic Value of Lanwei Acupuncture Point for Acute Appendicitis

Mehran Rezvani MD<sup>1</sup>, Helia Amidi<sup>2</sup>, Seyed Morteza Heydari MD<sup>1</sup>,  
Seyed Alireza Hosseiny MD<sup>3</sup>, Reza Eshraghi-Samani MD<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Appendicitis is the most common cause of acute abdomen often hard to be diagnosed that leads to high incidence of negative laparotomy. Therefore, clinical methods for the diagnosis of appendicitis with high sensitivity are necessary. This study aimed to evaluate the diagnostic value of Lanwei acupuncture point for acute appendicitis.

**Methods:** 150 patients admitted to Alzahra and Kashani hospitals, Isfahan, Iran, with suspected appendicitis were entered the study. The patients were examined using the tests Mcburney and Lanwei and then, went to the operating room and the appendix was assessed by pathologist. Finally, the results of pathology were compared with the results of Mcburney and Lanwei tests using t, chi-square test and ANOVA tests.

**Findings:** For Lanwei test, the sensitivity, specificity, false positive and false negative values were 22.6%, 23.5%, 77.4% and 76.5%, respectively, with the accuracy of 22.7%. But Mcburney test, the sensitivity, specificity, false positive and false negative values were 95.5%, zero, 100% and 4.5%, respectively, with the accuracy of 84.7%.

**Conclusion:** The Lanwei test did not have high agreement with the results of pathology other clinical criteria of diagnosing such as Mcburney test.

**Keywords:** Appendicitis; Lanwei; Mcburney

**Citation:** Rezvani M, Amidi H, Heydari SM, Hosseiny SA, Eshraghi-Samani R. **Diagnostic Value of Lanwei Acupuncture Point for Acute Appendicitis.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2172-8

1- Associate Professor, Department of Anesthesiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.  
3- Assistant Professor, Department of General Surgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran  
**Corresponding Author:** Mehran Rezvani MD, Email: rezvani@med.mui.ac.ir

## شناسایی جهش IVSII-1 ژن بتا گلوبین در ناقلین تالاسمی Minor با استفاده از روش High-Resolution Melting (HRM)

فاطمه آخوندی<sup>۱</sup>، دکتر مجتبی عمادی بایگی<sup>۲</sup>، دکتر منصور صالحی<sup>۳</sup>، دکتر پروانه نیکپور<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** بتا تالاسمی یکی از رایج‌ترین اختلالات اتوزومی مغلوب در جمعیت جهانی است که به وسیله بیش از ۲۰۰ جهش مختلف در زنجیره بتا گلوبین، ایجاد می‌شود. این بیماری، از نظر بالینی به سه حالت Minor، بینابینی و Major طبقه‌بندی می‌شود. بتا تالاسمی، رایج‌ترین بیماری تک ژنی در کشورهای مدیترانه، شرق میانه، شبه قاره هند، جنوب شرقی آسیا و یکی از اختلالات وراثتی گسترده در ایران است. از میان جهش‌های بتا تالاسمی مختلفی که در جمعیت ایران تشخیص داده شده است، IVSII-1 (G/A) شایع‌ترین جهش در بیشتر نواحی ایران است. هدف مطالعه حاضر، تعیین میزان اختصاصیت و حساسیت روش HRM (High-resolution melting) در تشخیص افراد حامل جهش IVSII-1 (G/A) از افرادی بود که این جهش را نداشتند.

**روش‌ها:** در این مطالعه، ۳۰ نمونه خون افراد مبتلا به تالاسمی Minor مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ هر نمونه، از قبل با استفاده از روش‌های PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) یا ARMS (Amplification-refractory mutation system) توالی‌یابی در آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرا (س) اصفهان مشخص شده بود. استخراج DNA از خون محیطی انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از روش HRM تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج بر اساس نمودارهای طبیعی‌سازی و تمایز، تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** در این مطالعه، روش HRM توانست افراد حامل جهش IVSII-1 را با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰ درصد شناسایی کند.

**نتیجه‌گیری:** روش HRM اختصاصیت و حساسیت بالایی دارد. از این رو، روش مناسبی برای تشخیص جهش‌های شایع انواع بیماری‌های ژنتیکی می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** بتا تالاسمی Minor، IVSII-1 (G/A) High-resolution melting (HRM)، نمودار طبیعی‌سازی، نمودار تمایز

**ارجاع:** آخوندی فاطمه، عمادی بایگی مجتبی، صالحی منصور، نیکپور پروانه. شناسایی جهش IVSII-1 ژن بتا گلوبین در ناقلین تالاسمی Minor با

استفاده از روش High-Resolution Melting (HRM). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۳۳: ۲۱۸۶-۲۱۷۹ (۳۶۳): ۲۱۷۹-۲۱۸۶

### مقدمه

سلول می‌شود. این فرایند هم در پیش‌سازهای نابالغ گلبول قرمز و هم در سلول‌های بالغ صورت می‌گیرد که منجر به کم‌خونی می‌شود. زنجیره بتا گلوبین، توسط ژن HBB کدگذاری می‌شود که به اندازه‌ی ۱۶۰۰ جفت باز روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ (11p15.4) قرار دارد (۲) و ۱۴۶ اسیدآمینو را کد می‌کند. توالی ژنومی HBB شامل سه اگزون، دو اینترون و ناحیه‌ی غیر ترجمه‌ای ۵' و ۳' (UTRs) یا (Untranslated regions) می‌باشد (۳).

واژه‌ی تالاسمی برای اولین بار در سال ۱۹۲۵ مطرح شد (۱). تالاسمی با کاهش یا عدم تولید زنجیره‌های آلفا ( $\alpha$ ) یا بتا ( $\beta$ ) گلوبین مشخص می‌شود، که نتیجه‌ی آن دو نوع اصلی  $\alpha$  یا  $\beta$  تالاسمی است. در بتا تالاسمی، نقص تولید بتا گلوبین باعث آنمی می‌شود، زنجیره‌های آلفای اضافی که داخل تترامر گنجانده نمی‌شوند، ترکیبات نامحلول و ناپایداری را تولید می‌کنند که باعث آسیب به غشا و تخریب زودرس

۱- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم و پژوهشکده‌ی زیست فن‌آوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

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

۴- استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان و پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیر واگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

Email: pnikpour@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر پروانه نیکپور

توسعه یافته‌اند که در آن تزیاید PCR و تعیین ژنوتیپ در یک لوله‌ی یکسان می‌تواند انجام شود. HRM (High-resolution melting) روش آنالیز جدیدی بعد از PCR محسوب می‌شود که با تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته شروع می‌شود. رنگ وقتی به DNA دو رشته‌ای متصل است، فلورسنس بالایی دارد و در حالت غیر بانندی فلورسنس پایینی دارد. تکثیر یا مرحله‌ی ذوب با قدرت تفکیک بالا دنبال می‌شود. وقتی DNA دو رشته به تک رشته تبدیل می‌شود، رنگ جدا شده باعث تغییر فلورسنس می‌گردد. نتیجه‌ی آن، منحنی ذوبی است که مشخصه‌ی آمپلیکون می‌باشد (۱۹-۱۸). هدف مطالعه‌ی حاضر، تعیین میزان اختصاصیت و حساسیت روش HRM در تشخیص افراد حامل جهش IVSII-1 (G/A) از افرادی بود که این جهش را نداشتند.

### روش‌ها

در این مطالعه، نمونه‌ی خون از افراد حامل تالاسمی که دارای جهش‌های مختلف در ژن HBB بودند، از آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرا (س) اصفهان جمع‌آوری شد و DNA با استفاده از کیت دیاتوم مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (IsoGen Co, Netherland) استخراج گردید.

جهت طراحی پرایمر، ابتدا توالی مربوط به ژن HBB از پایگاه اطلاعاتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) دریافت شد و سپس پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene runner 4.09 (<http://www.genrunner.com>) طراحی شد.

قطعه‌ی ۱۱۰ جفت بازی (bp یا Base pair) در برگرفته‌ی جهش مورد نظر، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، شامل  $5'CTCACCTGGACAACCTCAAG3'$  و  $5'ACATCAAGCGTCCCATAGAC3'$  واکنش در حجم  $25 \mu\text{l}$  حاوی  $2.5 \mu\text{l}$  از بافر  $10\times$ ،  $0.5 \mu\text{l}$  از dNTP،  $0.75 \mu\text{l}$  از  $\text{MgCl}_2$ ،  $0.75 \mu\text{l}$  از پرایمر  $0.5 \mu\text{l}$ ،  $0.25 \mu\text{l}$  از Taq DNA polymerase و  $3 \mu\text{l}$  از DNA و  $17 \mu\text{l}$  آب دیونیزه انجام شد (KBC, Iran).

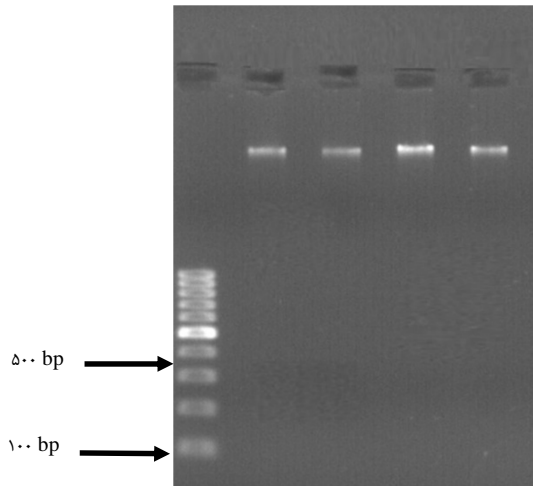
برنامه‌ی PCR با استفاده از دستگاه بیوتر (TC-XP-G) به صورت یک مرحله پیش دناتوراسیون در دمای  $95^\circ\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه و سپس  $35^\circ\text{C}$  چرخه شامل  $95^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه،  $60^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه،  $72^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها، طویل سازی انتهایی در  $72^\circ\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه اجرا شد. به منظور اطمینان از صحت انجام PCR،  $3 \mu\text{l}$  از محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. وجود باندهای  $110 \text{ bp}$  در زیر نور UV (Ultraviolet) نشان درستی انجام کار بود. رنگ فلورسنس Green viewer (Afratoos, Iran) جهت

تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش برای ژن بتا گلوبین گزارش شده است. بیشتر آن‌ها موتاسیون‌های نقطه‌ای در ناحیه‌ای مهم از ژن بتا گلوبین هستند. حذف در ژن بتا گلوبین رایج نیست. دو واریانت اصلی از آل‌های بتا تالاسمی وجود دارند. تالاسمی  $\beta^0$ ، در این افراد هیچ بتا گلوبینی تولید نمی‌شود و تالاسمی  $\beta^+$ ، که بتا گلوبین به مقدار کمتر از حد طبیعی تولید می‌شود (۴).

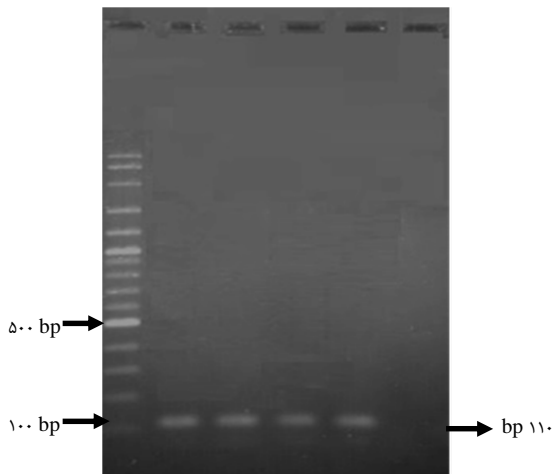
از نقطه نظر بالینی، تالاسمی به انواع Major، Minor و بینابینی طبقه‌بندی می‌شود (۵-۴). بتا تالاسمی در کشورهای اطراف دریای مدیترانه مانند یونان، ایتالیا، ترکیه و کشورهای آفریقای شمالی شایع می‌باشد. این بیماری همچنین در عربستان سعودی، پاکستان، ایران، افغانستان، هند و کشورهای آسیای شرقی مانند تایلند و اندونزی شیوع قابل توجهی دارد (۶). میزان بروز سالانه‌ی افراد علامت‌دار حدود ۱ به ۱۰۰۰۰۰ در سراسر جهان تخمین زده می‌شود. ایران در حدود ۲۰۰۰۰ بیمار هموزیگوس بتا تالاسمی و ۳۷۵۰۰۰۰ حامل دارد (۷). به خاطر وجود قومیت‌های مختلف در ایران، اساس مولکولی و شدت بالینی بتا تالاسمی در جمعیت ایران، هتروژن است. در مطالعات گذشته، جهش IVSII-1 (G/A) به عنوان شایع‌ترین آل‌ بتا تالاسمی در استان اصفهان (۸)، استان‌های شمالی (گیلان، مازندران و گلستان)، شمال غرب (آذربایجان و اردبیل) و جنوب کشور گزارش شده است (۹-۱۰). به طور کلی، جهش IVSII-1 (G/A) شایع‌ترین جهش در ایران است (۳۲/۹ درصد). این جهش مدیترانه‌ای در ایران فراوانی بالاتری نسبت به کشورهای مدیترانه‌ای دارد و شیب کاهشی شرق به غرب پیشنهاد می‌کند که ممکن است ایران منشأ این جهش باشد (۱۰).

آزمون‌های تشخیص بر پایه‌ی Polymerase chain reaction (PCR) جهت تشخیص هموگلوبینوپاتی‌ها شامل اولیگونوکلئوتید اختصاصی آل (ASO یا Allele-specific oligonucleotide) (۱۱) آزمون ARMS (Amplification-refractory mutation system) (۱۲) RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (۱۳) Gap-PCR (۱۴) و توالی‌یابی (۱۵) می‌باشند. این روش‌ها جهت شناسایی جهش‌های شناخته شده در انواع هموگلوبینوپاتی کاربرد دارند. در صورتی که سایر روش‌های بر پایه‌ی PCR، جهت شناسایی جهش‌های ناشناخته بر مبنای DNA تک رشته‌ای تغییر ساختار یافته طراحی می‌شوند و شامل روش‌هایی نظیر DGGE (Denaturation gradient gel electrophoresis) (۱۶) و SSCP (Single-strand conformation polymorphism) (۱۷) می‌باشند. بدین ترتیب، ناحیه‌ی هدف شناسایی می‌شود و در ادامه، تشخیص جهش مورد نظر انجام می‌گیرد. روش نهایی جهت تشخیص جهش، روش آنالیز مستقیم تعیین توالی می‌باشد.

در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های جدید در تشخیص مولکولی



شکل ۱. نتایج الکتروفورز DNAی استخراج شده از خون تام افراد مورد مطالعه بر روی ژل آگارز. باندهای DNA بیانگر کیفیت مناسب آن برای انجام مراحل بعدی می باشد.



شکل ۲. تکثیر قطعه‌ی ۱۱۰ جفت بازی. همان‌طور که در تصویر مشخص است، در دمای ۶۰ °C تکثیر برای نمونه‌های مختلف با موفقیت انجام شد.

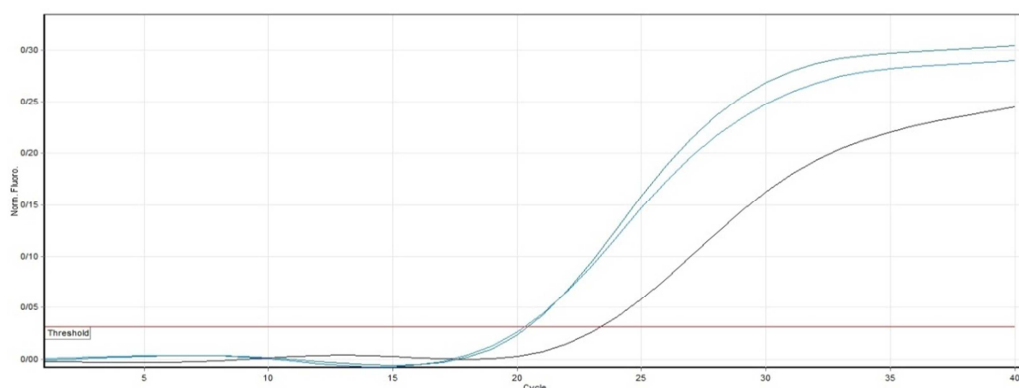
مشاهده‌ی باندها مورد استفاده قرار گرفت. بعد از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، با استفاده از دستگاه Rotor Gene Q، واکنش HRM در حجم ۱۰  $\mu$ l حاوی ۵  $\mu$ l مستر HRM، ۳/۹ آب RNase-free با استفاده از کیت Type it (Qiagen Co, Germany)، ۰/۳  $\mu$ l از هر پرایمر و ۰/۵  $\mu$ l از DNA انجام شد.

برنامه‌ی حرارتی دستگاه Rotor Gene Q به شرح زیر بود: مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ °C به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۱۰ ثانیه که با یک مرحله گرم کردن رشته‌های DNA تا ۹۰ °C و خنک کردن رشته‌ها تا ۴۰ °C ادامه یافت. سپس HRM به اندازه‌ی یک چرخه انجام شد که شامل افزایش دما از ۶۵ °C تا ۹۵ °C بود. دمایی که در آن نصف رشته‌های DNA به صورت تک رشته‌ای است، به عنوان دمای ذوب در نظر گرفته شد. سپس چند نمونه برای اطمینان از صحت قطعات تکثیر روی ژل ۱ درصد بارگذاری شدند.

#### یافته‌ها

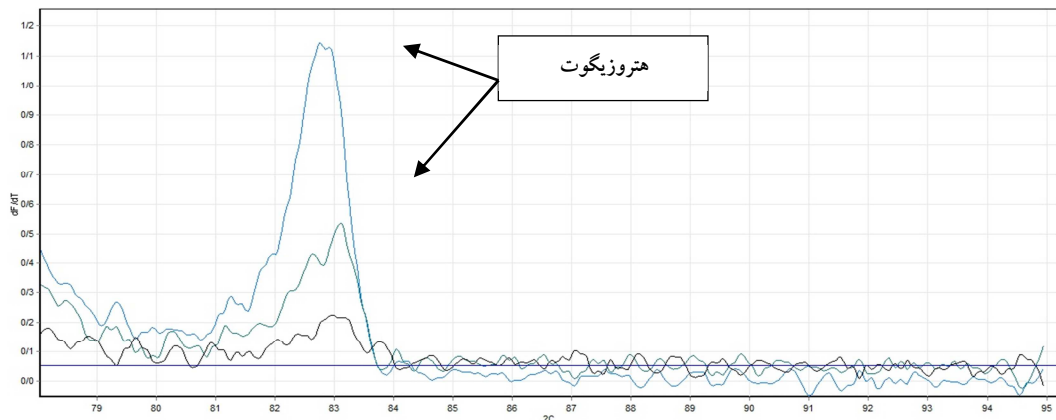
در این مطالعه، در مجموع ۳۰ نمونه از خون محیطی افراد ناقل تالاسمی Minor مورد استفاده قرار گرفت. از این تعداد، ۲۰ نمونه شایع‌ترین جهش تالاسمی در اصفهان IVSII-1(G/A) و ۱۰ نمونه جهش‌های دیگر از جمله IVSI-5، Fr8/9 و -۸۸ را داشتند که در این جا به عنوان نمونه‌ی شاهد محسوب شدند. همه‌ی نمونه‌ها با استفاده از روش HRM تعیین ژنوتیپ شدند.

در این پژوهش، بعد از استخراج نمونه‌های DNA و مشاهده‌ی باند بدون اسمیر (شکل ۱)، مقدار ۵۰ ng از آن‌ها برای بهینه‌سازی واکنش PCR معمولی (شکل ۲) و انجام HRM استفاده شد که ابتدا ۴۰ چرخه‌ی تکثیر برای افزایش کپی‌های DNA انجام شد (شکل ۳).



شکل ۳. منحنی تکثیر قطعه در دستگاه Real-time. افزایش رنگ متصل به DNAی دو رشته‌ای نشان دهنده‌ی تکثیر DNA به مقدار زیاد می باشد. خط Threshold نشان دهنده‌ی چرخه‌ای از PCR (Polymerase chain reaction) است که این افزایش کپی‌های DNA قابل شناسایی است.





شکل ۴. منحنی ذوب خام داده‌ها. با افزایش دما و تک رشته‌ای شدن DNA، رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای آزاد می‌شود و در جایی که دمای ذوب نام دارد، قله ایجاد می‌گردد که نشان دهنده تک رشته‌ای شدن نیمی از DNAهای دو رشته‌ای است. هتروزیگوت‌ها دارای دو قله می‌باشند که نشان دهنده دو همودوپلکس و دو هترودوپلکس می‌باشد.

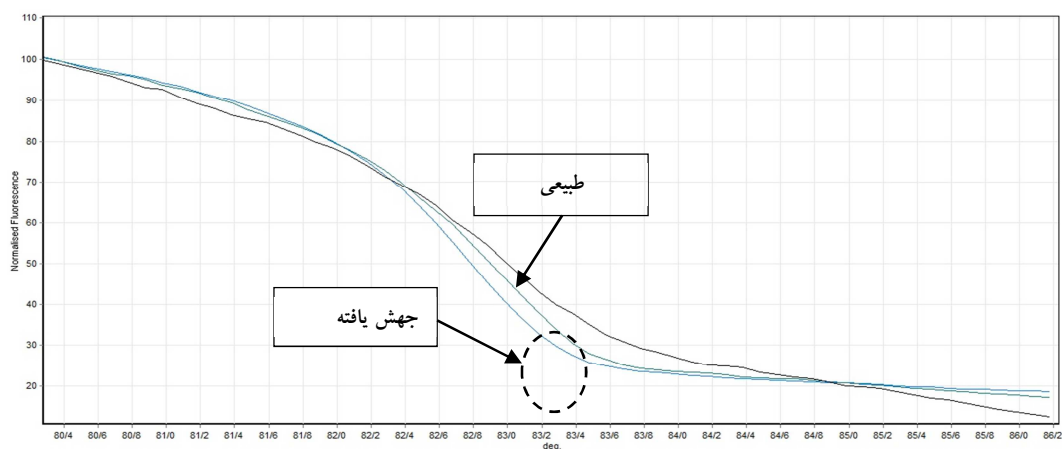
کرد که به آسانی از نمودار نمونه‌ی سالم قابل تشخیص بود (شکل ۶). در مجموع، نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش HRM نشان داد که این روش با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد می‌تواند افراد حامل جهش IVSII-1(G/A) را از سایر افراد افتراق دهد.

### بحث

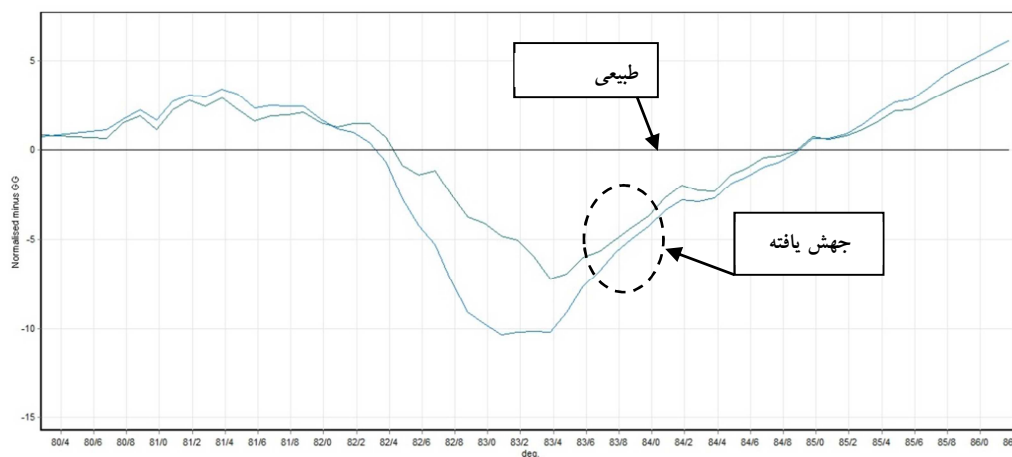
بیماری بتا تالاسمی در بیش از ۶۰ کشور که در مجموع به عنوان کمربند تالاسمی خوانده می‌شوند، گزارش شده است. وجود جهش بتا تالاسمیک مدیترانه‌ای IVSII-1 با فرکانس بالا در بیشتر قسمت‌های کشور به منشأ مستقل آن مربوط می‌شود (۲۰). این جهش مدیترانه‌ای، در ایران نسبت به ترکیه فراوانی بیشتری دارد و می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که منشأ این جهش، ایران است (۲۱-۲۲).

تفاوت چرخه‌ی آستانه برای نمونه‌ها نباید از ۳ تا بیشتر شود که در این جا چرخه‌ی آستانه‌ی نمونه‌ها چرخه‌ی ۲۰ بود. سپس برای این که فرصت کافی برای تشکیل هترودوپلکس‌ها فراهم شود، ابتدا دما تا ۹۰ °C افزایش داده شد و بعد تا ۴۰ °C کاهش یافت. در مرحله‌ی آخر، دما از ۶۵ °C تا ۹۵ °C به اندازه‌ی یک چرخه به آرامی افزایش داده شد که رنگ از DNA دو رشته‌ای با افزایش دما جدا شد. نمونه‌های هتروزیگوت به علت داشتن دو همودوپلکس و دو هترودوپلکس به حالت دو قله‌ای می‌باشند (شکل ۴).

سپس، با استفاده از نرم‌افزار Rotor Gene Q نسخه‌ی ۲/۰/۲ نمودار طبیعی‌سازی و تمایز ترسیم شد. با توجه به نمودار طبیعی‌سازی (شکل ۵) حالت هتروزیگوت برای جهش IVSII-1 شکل منحنی ذوب را نسبت به حالتی که این جهش را ندارد، تغییر می‌دهد. وجود توالی جهش یافته حتی در مقدار کم، نمودار تمایزی ایجاد



شکل ۵. نمودار طبیعی‌سازی شده‌ی نمونه‌های طبیعی و جهش‌دار. همان‌طور که در شکل مشخص است، شکل نمودار نمونه‌های جهش یافته‌ی هتروزیگوت GA نسبت به نمونه‌ی طبیعی متفاوت است.



شکل ۶. تمایز نمونه‌های جهش یافته از حالت طبیعی با استفاده از نمودار تمایز. همان‌طور که در شکل مشخص است، این نمودار باعث تفکیک نمونه‌های هتروزیگوت GA از نمونه‌ی طبیعی GG شد.

هتروزیگوت را در مقایسه با هموزیگوت طبیعی تغییر می‌دهد. تغییرات به وجود آمده، کوچک هستند؛ اما با استفاده از آنالیز منحنی ذوب با وضوح بالا تشخیص داده می‌شوند (۳۳).

در سال‌های اخیر، تحقیقاتی در رابطه با روش HRM انجام شده است. در یک مطالعه از Real-time gap-PCR و آنالیز HRM برای تشخیص حذف ۳/۵ کیلوبازی بتا تالاسمی استفاده شد. مشخص شد که موتاسیون به طور مستقیم از روی شکل منحنی ذوب می‌تواند تعیین ژنوتیپ شود (۳۴). همچنین، برای بررسی جهش ژن‌های *MCAD* (۳۵) و *c-kit* (۳۶) و رایج‌ترین تنوع‌های ژنتیکی *MTHFR* (۳۷)، از روش HRM استفاده شده است. دستگاه Real-time PCR امکان تکثیر نمونه‌ها، قبل از انجام HRM را در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای فراهم می‌کند.

در مطالعه‌ی حاضر، برای سنجش میزان اختصاصیت و حساسیت روش HRM در شناسایی جهش ژن بتا گلوبین، شایع‌ترین جهش استان اصفهان IVSII-1 (G/A) انتخاب شد. این جهش، در گذشته به روش ARMS در آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهراء (س) اصفهان در این افراد مشخص شده بود. حال بر اساس این پژوهش، اختصاصیت و حساسیت روش HRM در تمایز شدن ناقلین این جهش از افراد فاقد این جهش، بررسی شد. آنالیز منحنی ذوب با وضوح بالا و ترسیم منحنی طبیعی‌سازی و منحنی تمایز ۳۰ نمونه‌ی افراد ناقل تالاسمی Minor نشان دهنده‌ی این حقیقت است که روش HRM، توانایی لازم در مشخص کردن جهش مورد نظر را دارا می‌باشد.

در مطالعه‌ی مرعشی و همکاران، فرکانس فنوتیپی و ژنوتیپی رایج‌ترین جهش‌های بتا تالاسمی از جمله IVSII-1 (G/A) در قزوین با استفاده از روش HRM تعیین شد. در آن مطالعه،

اگر چه تعیین توالی مستقیم به عنوان روش استاندارد برای تعیین جهش‌های شناخته شده و نشده می‌باشد، اما به نسبت گران قیمت، سخت و زمان‌بر می‌باشد. روش‌های بر پایه‌ی PCR شامل پلی مورفیسم کنفورماسیون تک رشته‌ای (SSCP) (۲۳)، High-performance liquid chromatography (۲۴)، Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE) (۲۸)، پلی مورفیسم قطعات طولی محدود (RFLP) (۲۶)، ARMS (۲۵)، پلی مورفیسم قطعات طولی محدود (RFLP) (۲۶)، RDB (Reverse dot blot) (۲۹) برای مشخص کردن نوع جهش بتا تالاسمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها نیاز به جدایی محصولات PCR بر روی ژل یا ماتریکس دارند. اغلب چندین ساعت برای انجام شدن زمان لازم دارند و خطر آلودگی را به خاطر این که محصولات PCR در معرض محیط قرار می‌گیرند، افزایش می‌دهند (۳۰). درخواست برای تشخیص سریع و قابل اعتماد و شناسایی واریانت هموگلوبین و انواع تالاسمی برای تمایز نوع جهش نمونه‌های بالینی، درمان هدفمند یا مشاوره به سرعت در حال افزایش است. در حالی که بعضی روش‌ها برای پیدا کردن جهش‌های ژن بتا گلوبین در مقیاس بالا، گران قیمت و زمان‌بر هستند، روش HRM نشان دهنده‌ی نسل جدید تکنولوژی اسکن جهش می‌باشد و صرفه‌جویی در هزینه و زمان قابل توجهی را نسبت به روش‌های پیش گفته، ارائه می‌دهد (۳۱).

در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای اشیاع شده، نمونه‌ها به صورت آرام گرم می‌شوند تا به طور کامل دناتوره شوند. در حالی که فلورسنس با گرم شدن DNA دو رشته و تک رشته‌ای شدن آن، آزاد می‌شود (۳۲). بعد از تکثیر شدن هتروزیگوت‌ها در حضور رنگ متصل به DNA دو رشته‌ای، دو همودوپلکس و دو هتروودوپلکس شکل می‌گیرد. وجود هتروودوپلکس، شکل منحنی ذوب تکثیر یافته‌ی

آنالیز HRM یکی از روش‌های مقرون به صرفه در آزمایشگاه تشخیص طبی با حجم نمونه‌ی متوسط تا بالا می‌باشد (۳۹).

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد فاطمه آخوندی بوده و با حمایت مالی دانشگاه شهرکرد به انجام رسیده است. از کلیه‌ی پرسنل آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان الزهرا (س) اصفهان که در تهیه‌ی نمونه‌ها و جمع‌آوری اطلاعات بیماران همکاری صمیمانه‌ای داشتند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

اختصاصیت و حساسیت روش HRM در مشخص کردن جهش IVSII-1 (G/A) ۱۰۰ درصد بود که این یافته با نتیجه‌ی به دست آمده در پژوهش حاضر همسو است (۳۸).

محدودیت اصلی روش HRM این است که ماهیت دقیق جهش به آسانی قابل شناسایی نمی‌باشد؛ بنا بر این لازم است که همراه روش توالی‌یابی مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود، روش HRM روشی حساس، ارزان قیمت و با دقت بالا می‌باشد. همچنین، آنالیز HRM از مزایایی شامل کاهش نیروی انسانی، صرفه‌جویی در زمان و کاهش خطر آلودگی نسبت به سایر روش‌ها برخوردار می‌باشد. به علاوه،

### References

- Vichinsky EP, MacKlin EA, Wayne JS, Lorey F, Olivieri NF. Changes in the epidemiology of thalassemia in North America: a new minority disease. *Pediatrics* 2005; 116(6): e818-e825.
- Lahiry P, Al-Attar SA, Hegele RA. Understanding beta-thalassemia with focus on the Indian subcontinent and the Middle East. *Open Hematol J* 2008; 2(1): 5-13.
- Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med* 2005; 353(11): 1135-46.
- Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2007; 67(1): 11-26.
- Urbinati F, Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. *Expert Rev Mol Med* 2006; 8(10): 1-26.
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* 1998; 11(1): 1-51.
- Karimi M, Jamalian N, Yarmohammadi H, Askarnejad A, Afrasiabi A, Hashemi A. Premarital screening for beta-thalassaemia in Southern Iran: options for improving the programme. *J Med Screen* 2007; 14(2): 62-6.
- Salehi R, Fisher CA, Bignell PA, Eslami G, Old JM. Identification of three novel mutations [-41 (A>C), codon 24 (-G), and IVS-I-109 (-T)], in a study of beta-thalassemia alleles in the Isfahan region of Iran. *Hemoglobin* 2010; 34(1): 115-20.
- Derakhshandeh-Peykar P, Akhavan-Niaki H, Tamaddoni A, Ghawidel-Parsa S, Naieni KH, Rahmani M, et al. Distribution of beta-thalassemia mutations in the northern provinces of Iran. *Hemoglobin* 2007; 31(3): 351-6.
- Hosseinpour Feizi MA, Hosseinpour Feizi AA, Pouladi N, Haghi M, Azarfam P. Molecular spectrum of beta-thalassemia mutations in Northwestern Iran. *Hemoglobin* 2008; 32(3): 255-61.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(16): 6230-4.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17(7): 2503-16.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-4.
- Phylipsen M, Amato A, Cappabianca MP, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Basak N, et al. Two new beta-thalassemia deletions compromising prenatal diagnosis in an Italian and a Turkish couple seeking prevention. *Haematologica* 2009; 94(9): 1289-92.
- Chern SR, Chen CP. Molecular prenatal diagnosis of thalassemia in Taiwan. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 69(2): 103-6.
- Vrettou C, Palmer G, Kanavakis E, Tzetzis M, Antoniadis T, Mastrominas M, et al. A widely applicable strategy for single cell genotyping of beta-thalassaemia mutations using DGGE analysis: application to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1999; 19(13): 1209-16.
- Takahashi-Fujii A, Ishino Y, Kato I, Fukumaki Y. Rapid and practical detection of beta-globin mutations causing beta-thalassemia by fluorescence-based PCR-single-stranded conformation polymorphism analysis. *Mol Cell Probes* 1994; 8(5): 385-93.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem* 2004; 50(7): 1156-64.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49(6 Pt 1): 853-60.
- Rahimi Z. Genetic epidemiology, hematological and clinical features of hemoglobinopathies in Iran. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 803487.
- Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, Miller W, Chui DH, Anagnou NP, et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(Database issue): D537-D541.
- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S,

- Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin* 2001; 25(3): 285-96.
23. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8): 2766-70.
  24. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17(6): 439-74.
  25. Li Q, Liu Z, Monroe H, Culiati CT. Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 2002; 23(10): 1499-511.
  26. Sanguanserm Sri P, Shimbhu D, Wongvilairat R, Sanguanserm Sri T. Associations of common beta-thalassemia mutations with beta-globin gene frameworks in Northern Thailand. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, 2004; 21(1): 53-6.
  27. Tan JA, Tay JS, Lin LI, Kham SK, Chia JN, Chin TM, et al. The amplification refractory mutation system (ARMS): a rapid and direct prenatal diagnostic technique for beta-thalassaemia in Singapore. *Prenat Diagn* 1994; 14(11): 1077-82.
  28. Shaji RV, Edison ES, Poonkuzhali B, Srivastava A, Chandy M. Rapid detection of beta-globin gene mutations and polymorphisms by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Clin Chem* 2003; 49(5): 777-81.
  29. Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutations in Asians and American blacks. *Hum Mutat* 1994; 3(1): 59-63.
  30. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem* 2003; 49(5): 769-76.
  31. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007; 8(6): 597-608.
  32. Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat Protoc* 2007; 2(1): 59-66.
  33. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 2004; 50(10): 1748-54.
  34. Prathomtanapong P, Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguanserm Sri T. Detection and identification of beta-thalassemia 3.5 kb deletion by SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol* 2009; 82(2): 159-60.
  35. McKinney JT, Longo N, Hahn SH, Matern D, Rinaldo P, Strauss AW, et al. Rapid, comprehensive screening of the human medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mol Genet Metab* 2004; 82(2): 112-20.
  36. Willmore C, Holden JA, Zhou L, Tripp S, Wittwer CT, Layfield LJ. Detection of c-kit-activating mutations in gastrointestinal stromal tumors by high-resolution amplicon melting analysis. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(2): 206-16.
  37. Norambuena PA, Copeland JA, Krenkova P, Stambergova A, Macek M, Jr. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *Clin Biochem* 2009; 42(12): 1308-16.
  38. Marashi SJ, Eshkoo SA, Mirinargesi MS, Reza M. Detection of eight common  $\beta$ -globin gene mutation in thalassemia major patients using real time polymerase chain reaction (PCR)-high resolution melting and EvaGreen™ dye. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(2): 1486-96.
  39. Shih HC, Er TK, Chang TJ, Chang YS, Liu TC, Chang JG. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clin Biochem* 2009; 42(16-17): 1667-76.

## Detection of IVSII-1 Mutation of Beta Globin Gene in Carriers of Thalassemia Minor Using High-Resolution Melting Analysis

Fatemeh Akhondi MSc<sup>1</sup>, Mojtaba Emadi-Baygi PhD<sup>2</sup>, Mansour Salehi PhD<sup>3</sup>, Parvaneh Nikpour PhD<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Beta-thalassemia is one of the most common autosomal recessive disorders in the world population caused by more than 200 different mutations in the beta-globin chain. It is clinically classified as minor, intermediate and major. Beta-thalassemia is the most common monogenic disease in the Mediterranean countries, Middle East, Indian Subcontinent, and Southeast Asia and one of the widespread hereditary disorders in Iran. Among different  $\beta$ -thalassemia mutations identified among Iranian populations, IVSII-1 (G/A) is the most frequent mutation in different regions of Iran. This study aimed to determine the specificity and sensitivity of high-resolution melting (HRM) method in the diagnosis of individuals carrying IVSII-1 (G/A) mutations from patients who do not have this mutation.

**Methods:** In this study, blood samples collected from 30 individuals carrying minor thalassemia were assessed. The genotype of each sample was previously determined via the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) or amplification-refractory mutation system (ARMS) or sequencing method in the genetic laboratory of Al-Zahra hospital, Isfahan, Iran. DNA extraction from peripheral blood was performed and high-resolution melting method was used for genotype samples. The results were analyzed according to the normalized and difference plots.

**Findings:** High-resolution melting analysis identified individuals carrying IVSII-1 (G/A) mutation with a sensitivity and specificity of 100%.

**Conclusion:** In summary, high-resolution melting method showed high sensitivity and specificity. Therefore, it is an appealing technique for identification of common mutations in genetic diseases.

**Keywords:** Beta thalassemia minor; IVSII-1(G/A), High-resolution melting (HRM); Normalized plot; Difference plot

**Citation:** Akhondi F, Emadi-Baygi M, Salehi M, Nikpour P. **Detection of IVSII-1 Mutation of Beta Globin Gene in Carriers of Thalassemia Minor Using High-Resolution Melting Analysis.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2179-86

1- Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Assistant Professor, Department of Genetics School of Basic Sciences AND Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

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

4- Assistant Professor, Applied Physiology Research Center AND Child Growth and Development Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Parvaneh Nikpour PhD, Email: pnikpour@med.mui.ac.ir

## بررسی تأثیر پیش‌گیرانه‌ی تزریق میدازولام، اندانسترون و ترکیب میدازولام- اندانسترون روی تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی گوش میانی و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد

دکتر عظیم هنرمند<sup>۱</sup>، دکتر سید محمدرضا صفوی<sup>۱</sup>، منصوره چگنی<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** هدف این مطالعه، بررسی اثر پیش‌گیرانه‌ی ترکیب میدازولام- اندانسترون روی تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی (Postoperative nausea and vomiting) یا PONV گوش میانی و مقایسه‌ی آن با اثر میدازولام و اندانسترون به تنهایی است.

**روش‌ها:** ۱۴۰ بیمار در چهار گروه تقسیم‌بندی شدند و ۰/۷۵ mg/kg میدازولام، ۴ mg اندانسترون، ۰/۷۵ mg/kg میدازولام به همراه ۴ mg اندانسترون و یا نرمال سالین ۰/۹ درصد (شاهد) به صورت وریدی و قبل از بیهوشی دریافت نمودند. بررسی تهوع و استفراغ، مصرف داروی ضد تهوع و عوارض داروها مثل سردرد و سرگیجه بعد از عمل جراحی به مدت ۲۴ ساعت انجام شد.

**یافته‌ها:** میزان بروز تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی به طور چشم‌گیری در گروه میدازولام- اندانسترون کمتر از دو گروه میدازولام و اندانسترون بود ( $P < ۰/۰۰۱$ ) و تفاوت چشم‌گیری بین گروه‌های میدازولام و اندانسترون در ۲۴ ساعت اول بعد از عمل وجود نداشت. نیاز به داروی ضد تهوع اضافی در گروه شاهد (۷۱/۴ درصد) به طور چشم‌گیری بیشتر از سایر گروه‌ها و در گروه میدازولام- اندانسترون (۱۱/۴ درصد) کمتر از گروه‌های میدازولام (۳۱/۴ درصد) و اندانسترون (۳۴/۳ درصد) بود ( $P < ۰/۰۰۱$ ).

**نتیجه‌گیری:** تجویز ترکیب میدازولام- اندانسترون در پیش‌گیری از تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی مؤثرتر از تجویز میدازولام و اندانسترون به تنهایی است.

**واژگان کلیدی:** تهوع و استفراغ بعد از عمل، عمل گوش میانی، میدازولام، اندانسترون

**ارجاع:** هنرمند عظیم، صفوی سید محمدرضا، چگنی منصوره. بررسی تأثیر پیش‌گیرانه‌ی تزریق میدازولام، اندانسترون و ترکیب میدازولام- اندانسترون روی تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی گوش میانی و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۱۸۷-۲۱۹۲

### مقدمه

تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی (PONV یا Postoperative nausea and vomiting)، از عوارض شایع و اضطراب‌آور و نگرانی اصلی ۷۰-۴۰ درصد بیماران است که تحت اعمال جراحی قرار می‌گیرند (۱-۲). تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی، فقط سبب رنج و ناراحتی بیماران نمی‌شود؛ بلکه می‌تواند سبب طولانی شدن زمان ماندن بیماران در بخش مراقبت‌های بعد از بیهوشی و عوارض جدی مثل اختلالات الکترولیتی، آسپیراسیون، افزایش خون‌ریزی و باز شدن زخم شود (۳-۴).

بیمارانی که از تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی رنج می‌برند، نیازمند مراقبت‌های بیشتر و اختصاصی‌تری هستند (۳). میزان تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی، حدود ۳۰-۲۵ درصد در جراحی‌های

عمومی و ۸۰-۶۲ درصد بعد از اعمال جراحی گوش میانی است (۵). عوامل بسیاری نظیر محل و خصوصیات عمل جراحی، نوع بیهوشی، نوع داروی بیهوشی، سن، جنس، وزن بیمار و سرگیجه، می‌توانند روی تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی مؤثر باشند (۶-۷). زمان و دز داروی ضد استفراغ مورد استفاده نیز مهم است (۸-۱۶).

اندانسترون آنتاگونیست گیرنده‌ی 5-HT<sub>3</sub> سروتونین می‌باشد که به طور معمول جهت پیش‌گیری و درمان تهوع و استفراغ در طی عمل و بعد از عمل جراحی به کار می‌رود (۱۷). این دارو با جلوگیری از عمل سروتونین که یک ماده‌ی طبیعی ایجاد کننده‌ی تهوع و استفراغ است، عمل می‌کند. میدازولام در گروه بنزودیازپین‌ها قرار می‌گیرد و با آهسته کردن فعالیت‌های مغزی، سبب آرامش و کاهش هوشیاری می‌شود. با توجه به نبود مطالعه‌ای در زمینه‌ی تأثیر

۱- استاد، گروه بیهوشی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات بیهوشی و مراقبت‌های ویژه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

Email: mansourehchegeni@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: منصوره چگنی



نشان می‌داد. در صورت بروز تهوع و استفراغ با نمره‌ی ۲ یا بیشتر، بیمار ۰/۱۵ mg/kg متوکلوپرامید وریدی دریافت می‌نمود و دز آن ثبت می‌گردید. زمان شروع رژیم مایعات خوراکی نیز ثبت شد. در صورت بروز درد با VAS ۴ یا بیشتر از آن، برای بیماران شیاف دیکلوفناک ۵۰ mg تجویز و دز آن ثبت می‌شد.

جدول ۱. امتیاز تهوع و استفراغ

امتیاز	تهوع و استفراغ
۰	تهوع ندارد، استفراغ ندارد
۱	تهوع دارد، استفراغ ندارد
۲	تهوع دارد، استفراغ دارد
۳	استفراغ بیش از ۲ مرتبه در دقیقه

مدت اقامت در ریکاوری بر اساس Modified Aldrete score ارزیابی شد. همچنین، مدت زمان اکستوباسیون (از زمان قطع داروی بیهوشی تا خروج تیوب) نیز تعیین گردید. میزان رضایتمندی بیماران بر اساس معیار VAS ارزیابی شد. پاسخ کامل به دارو بر اساس نبود تهوع و استفراغ در ۲۴ ساعت اول بعد از عمل تعریف می‌شود. ارزیابی سطح هوشیاری در زمان‌های ارزیابی تهوع و استفراغ بر اساس OAA/S (Observer's assessment of alertness/sedation) صورت گرفت (۱ = بیدار و هوشیار و ۵ = خواب عمیق). داده‌های مطالعه پس از جمع‌آوری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آماری t،  $\chi^2$ ، One-way ANOVA و Kruskal-Wallis تجزیه و تحلیل گردید.

### یافته‌ها

۱۴۰ بیمار به طور تصادفی در چهار گروه تقسیم‌بندی شدند و هیچ بیماری از مطالعه خارج نشد. مشخصات بیمار، نوع عمل جراحی، مدت زمان عمل، مدت زمان بیهوشی، زمان تا شروع مایعات، زمان اکستوباسیون، مدت زمان اقامت در بخش مراقبت‌های ویژه و میزان رضایتمندی بیماران در جدول ۲ آمده است. زمان تا شروع مایعات در گروه شاهد از سایر گروه‌ها بیشتر است ( $P < 0/001$ ). مدت زمان اقامت در بخش مراقبت‌های ویژه در چهار گروه تفاوت چشم‌گیری نداشت و رضایتمندی بیماران در گروه میدازولام- اندانسترون از سایر گروه‌ها بیشتر بود ( $P < 0/001$ ) (جدول ۲).

بعد از عمل، در گروه میدازولام ۱۱ بیمار (۳۱/۴ درصد)، در گروه اندانسترون ۱۲ بیمار (۳۴/۲ درصد)، در گروه میدازولام- اندانسترون ۴ بیمار (۱۱/۴ درصد) و در گروه شاهد ۲۵ بیمار (۷۱/۴ درصد)

این داروها، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تأثیر تزریق ترکیب میدازولام- اندانسترون بر تهوع و استفراغ بعد از اعمال جراحی گوش میانی در مقایسه با استفاده‌ی این داروها به تنهایی انجام شد.

### روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع کارآزمایی بالینی تصادفی شده‌ی دو سو کور بود که بعد از اخذ مجوز از کمیته‌ی پژوهشی دانشگاه و اخذ رضایت کتبی از بیماران در سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ در مرکز پزشکی آیه‌اله کاشانی اصفهان انجام گرفت. مطالعه بر روی ۱۴۰ بیمار با درجه‌ی I و یا II عمل جراحی انتخابی گوش میانی (American Society of Anesthesiologists) ASA (Tympanoplasty و Mastoidectomy) با سن ۶۲-۱۸ سال انجام شد. بیمارانی وارد مطالعه شدند که طی ۲۴ ساعت گذشته، هیچ نوع داروی ضد تهوع دریافت نکرده بودند؛ همچنین، شرح حالی از Motion sickness نمی‌دادند و مصرف کننده‌ی سیگار نبودند. بیمارانی که مخدر مصرف می‌کردند یا باردار بودند، وارد مطالعه نشدند. در صورت هر گونه تغییر در روش بیهوشی، بیماران از مطالعه خارج می‌شدند.

۱۴۰ بیمار به روش تصادفی ساده در چهار گروه تقسیم‌بندی شدند که ۰/۷۵ mg/kg میدازولام، ۴ mg اندانسترون، ۰/۷۵ mg/kg میدازولام به همراه ۴ mg اندانسترون و یا نرمال سالین ۰/۹ درصد (شاهد) به صورت وریدی و قبل از بیهوشی دریافت نمودند. داروهای مورد مطالعه توسط متخصص بیهوشی در سرنگ‌های مشابه و حجم‌های یکسان آماده و تزریق شد. جمع‌آوری داده‌ها توسط فردی که هیچ گونه اطلاعی در مورد داروها نداشت، انجام شد.

بیماران با روش استاندارد، تحت القای بیهوشی با ۵ mg/kg Sodium thiopental، ۲  $\mu$ g/kg Phentanyl و ۰/۶ mg/kg Atracurium قرار گرفتند. بعد از شلی کامل، بیماران ایتوبه شدند و تحت بیهوشی با تزریق ۱۰۰-۱۵۰ mg/kg/min Prepopul به همراه اکسیژن قرار گرفتند. جهت بی‌دردی حین عمل، مورفین ۰/۱ mg/kg به صورت وریدی تزریق شد. در انتهای عمل، شلی عضلانی با استفاده از نئوستیگمین ۰/۴ mg/kg و آتروپین ۰/۲ mg/kg برگردانده شد و بعد بیمار اکستوبه گردید. تهوع و استفراغ با استفاده از معیار تهوع و استفراغ (Nausea vomiting scale یا NVS) ۰-۲ ساعت بعد از ورود به بخش و ۲-۲۴ ساعت بعد از آن ارزیابی شد (جدول ۱).

استفراغ خروج محتویات معده از دهان با شدت یا آروغ زدن تعریف می‌شود (۱۸). درد و تهوع بیماران بعد از عمل نیز با استفاده از معیار VAS (Visual analogue scale) در ۰-۲ ساعت بعد از ورود به بخش و ۲-۲۴ ساعت بعد از آن ارزیابی شد. صفر به معنای عدم وجود درد یا PONV و ۱۰، بدترین و بدخیم‌ترین درد یا PONV را

گروه‌های میدازولام و اندانسترون چشم‌گیر نبود؛ هر چند که در این دو گروه PONV نسبت به گروه شاهد کمتر بود (جدول ۳).  
تهوع بر اساس معیار VAS در گروه میدازولام- اندانسترون از سایر گروه‌ها کمتر بود. در سنجش درد بر اساس معیار VAS تفاوت چشم‌گیری بین گروه‌ها دیده نشد.

0/15 mg/kg متوکلوپرامید وریدی دریافت نمودند و تفاوت چشم‌گیری بین گروه میدازولام- اندانسترون و سایر گروه‌ها وجود داشت (P < 0/001).  
PONV در آن دسته از بیمارانی که ترکیب میدازولام- اندانسترون را دریافت نمودند، به وضوح کمتر از سایر گروه‌ها بود. تفاوت بین

جدول ۲. اطلاعات آماری و پاراکلینیکال بیماران

مقدار P	شاهد (تعداد = ۳۵)	میدازولام- اندانسترون (تعداد = ۳۵)	اندانسترون (تعداد = ۳۵)	میدازولام (تعداد = ۳۵)	گروه	متغیر
0/815	25/6 ± 13/5	28/5 ± 13/6	26/4 ± 13/6	27/6 ± 12/5	سن (سال)	
0/424	69/4 ± 8/5	71/5 ± 8/8	70/0 ± 9/6	72/7 ± 9/61	وزن (کیلوگرم)	
0/167	29/6	21/1	26/9	12/2	جنس (مرد/زن)	
0/998	15/2	14/2	16/2	13/2	نسبت ASA (II/I)	
0/923	19	15	17	20	نوع عمل	ماستوئید کتومی
	10	11	10	9		تیمپانوپلاستی
	6	9	8	6		ماستوئید کتومی و تیمپانوپلاستی
0/188	132/3 ± 13/4	136/4 ± 12/7	135/0 ± 12/9	138/5 ± 9/2	مدت زمان عمل (دقیقه)	
0/188	144/7 ± 13/4	148/8 ± 12/7	147/5 ± 12/9	150/9 ± 9/2	مدت زمان بیهوشی (دقیقه)	
< 0/001	6/3 ± 1/5	2/3 ± 5/6	3/4 ± 1/0	3/2 ± 0/9	زمان تا شروع مایعات (ساعت)	
0/759	13/6 ± 2/6	14/3 ± 2/9	14/0 ± 2/8	13/8 ± 2/6	زمان اکستوباسیون (دقیقه)	
0/057	51/2 ± 5/2	52/9 ± 5/2	54/6 ± 5/3	53/5 ± 5/3	مدت زمان اقامت در بخش مراقبت‌های ویژه (دقیقه)	
< 0/001	4/1 ± 2/0	8/2 ± 0/9	5/7 ± 1/4	5/9 ± 1/4	رضایتمندی بیماران	

ASA: American Society of Anesthesiologist

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

گروه میدازولام 0/75 mg/kg، میدازولام، گروه اندانسترون 4 mg، اندانسترون، گروه میدازولام- اندانسترون 0/75 mg/kg و میدازولام و 4 mg اندانسترون و گروه شاهد سالین 0/9 به صورت وریدی دریافت نمودند.

جدول ۳. میزان بروز تهوع، استفراغ، تهوع و استفراغ و نیاز به داروی ضد تهوع در چهار گروه بیماران (تعداد برای هر گروه = ۳۵)

مقدار P	شاهد (تعداد درصد)	میدازولام- اندانسترون (تعداد درصد)	اندانسترون (تعداد درصد)	میدازولام (تعداد درصد)	گروه	متغیر
< 0/001	10 (28/6)	31 (88/6)	23 (65/7)	24 (68/6)	0	PONV در ساعت ۰-۲
	7 (20)	2 (5/7)	6 (17/1)	5 (14/3)	1	
	14 (40/0)	1 (2/9)	6 (17/1)	5 (14/3)	2	
	4 (11/4)	1 (2/9)	0 (0/0)	1 (2/9)	3	
< 0/001	12 (34/3)	32 (91/4)	24 (68/6)	25 (71/4)	0	PONV در ساعت ۲-۲۴
	7 (20/0)	2 (5/7)	6 (17/1)	5 (14/3)	1	
	13 (37/1)	1 (2/9)	5 (14/3)	4 (11/4)	2	
	3 (8/6)	0 (0/0)	0 (0/0)	1 (2/9)	3	
< 0/001	25 (71/4)	4 (11/4)	12 (34/3)	11 (31/4)		نیاز به داروی ضد تهوع

PONV: Postoperative nausea and vomiting

گروه میدازولام 0/75 mg/kg، میدازولام، گروه اندانسترون 4 mg، اندانسترون، گروه میدازولام- اندانسترون 0/75 mg/kg و میدازولام و 4 mg اندانسترون و گروه شاهد سالین 0/9 به صورت وریدی دریافت نمودند.

درجه‌بندی PONV: ۰: تهوع ندارد، استفراغ ندارد، ۱: تهوع دارد، استفراغ ندارد، ۲: تهوع دارد، استفراغ دارد، ۳: استفراغ بیش از ۲ مرتبه در دقیقه



## بحث

تهوع و استفراغ بعد از عمل، بهبود بعد از عمل، مدت زمان بستری در بیمارستان، هزینه و کیفیت زندگی بیمار را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). اگر چه علائم به طور معمول زودگذر است، اما می‌تواند منجر به عوارض جدی مثل آسپیراسیون ریوی، باز شدن زخم و عدم تعادل آب و الکترولیت شود (۱۸-۱۹، ۱۴-۱۲، ۱۰، ۸-۷). تهوع و استفراغ بعد از عمل، تحت تأثیر عوامل زیادی مثل نوع، محل و مدت عمل، سن، جنس، وزن و سابقه‌ی سرگیجه در اتومبیل قرار دارد (۱۹، ۱۶-۱۲، ۸-۷).

استفاده از آنتاگونیست گیرنده‌ی 5-HT<sub>3</sub> جهت پیش‌گیری خوب از PONV رایج است (۲۵-۲۰، ۳). گزارش شده است که پس از استفاده‌ی پیش‌گیرانه‌ی ۴ mg اندانسترون در عمل Radical mastoidectomy، ۳۳ درصد تهوع و استفراغ اتفاق افتاده است؛ در حالی که بدون آن در ۸۱/۵ درصد موارد، تهوع و استفراغ روی داده است (۲۷-۲۶). Tramer و همکاران دریافتند که اثر ضد استفراغ اندانسترون از اثر ضد تهوع آن بهتر است (۲۹-۲۸). در این مطالعه، آن دسته از بیمارانی که در ۲۴ ساعت اول اندانسترون دریافت کردند، تهوع بیشتری نسبت به بیمارانی که میدازولام دریافت کرده بودند، نشان دادند؛ اگر چه این تفاوت چشم‌گیر نبود.

Splinter و همکاران مشاهده کردند که اثر ضد تهوع تجویز ۰/۰۵ mg/kg میدازولام پس از القای بیهوشی، مشابه تجویز Droperidol در کودکان تحت عمل جراحی استرابیسم است (۳۰). Bauer و همکاران دریافتند که تجویز ۰/۰۴ mg/kg میدازولام وریدی قبل از عمل، میزان PONV را کاهش و رضایتمندی بیمار را افزایش می‌دهد (۳۱). به تازگی، Unlugenc و همکاران مشاهده نمودند که تجویز میدازولام با دزی کمتر از دز خواب‌آوری، می‌تواند به اندازه‌ی اندانسترون در درمان PONV مؤثر واقع شود (۳۲). در این مطالعه، اثر ضد تهوع ترکیب میدازولام-اندانسترون با

تجویز هر کدام از آن‌ها به تنهایی و نیز گروه شاهد مقایسه شد. همچنین، بروز و شدت تهوع و استفراغ و تعداد بیماران دچار تهوع و استفراغی که به داروی ضد تهوع اضافه نیاز پیدا کردند، در زمان‌های ۰-۲ ساعت و ۲-۲۴ ساعت بررسی گردید.

در این مطالعه، مشاهده شد که میزان بروز PONV به طور چشم‌گیری در گروه میدازولام-اندانسترون کمتر از گروه میدازولام و گروه اندانسترون بود و تفاوت چشم‌گیری بین گروه میدازولام و گروه اندانسترون در ۲۴ ساعت اول بعد از عمل وجود نداشت. نیاز به داروی ضد تهوع اضافه در گروه میدازولام-اندانسترون به طور چشم‌گیری کمتر از گروه میدازولام و گروه اندانسترون بود. در نهایت، چنین استنباط شد که تجویز ترکیب میدازولام-اندانسترون در پیش‌گیری از PONV مؤثرتر از تجویز هر کدام از آن‌ها به تنهایی است. همچنین، درد بر اساس معیار VAS مورد سنجش قرار گرفت که تفاوت خاصی بین چهار گروه دیده نشد و در نتیجه، درد تأثیری بر روی PONV نداشت.

در پایان، می‌توان گفت مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ترکیب میدازولام-اندانسترون در پیش‌گیری از تهوع و استفراغ بعد از عمل جراحی در ۲۴ ساعت اول مؤثرتر از میدازولام و اندانسترون به تنهایی است. پیشنهاد می‌شود که این ترکیب در اعمال جراحی با بروز بالای تهوع و استفراغ مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای منصوره چگنی به شماره‌ی طرح ۳۹۲۱۱۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، تمامی پزشکان مرکز آموزشی-درمانی آیت‌اله کاشانی و بیماران و خانواده‌ی محترمشان که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

## References

- Koivuranta MK, Laara E, Ryhanen PT. Antiemetic efficacy of prophylactic ondansetron in laparoscopic cholecystectomy. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Anaesthesia* 1996; 51(1): 52-5.
- Gan T, Sloan F, Dear GL, El-Moalem HE, Lubarsky DA. How much are patients willing to pay to avoid postoperative nausea and vomiting? *Anesth Analg* 2001; 92(2): 393-400.
- Chen X, Tang J, White PF, Wender RH, Quon R, Sloninsky A, et al. The effect of timing of dolasetron administration on its efficacy as a prophylactic antiemetic in the ambulatory setting. *Anesth Analg* 2001; 93(4): 906-11.
- Frighetto L, Loewen PS, Dolman J, Marra CA. Cost-effectiveness of prophylactic dolasetron or droperidol vs rescue therapy in the prevention of PONV in ambulatory gynecologic surgery. *Can J Anaesth* 1999; 46(6): 536-43.
- Isik B, Cekmen N, Arslan M, Ozsoylar O, Kordan AZ, Akcabay M. Comparison of the antiemetic effects of ondansetron and dexamethasone on middle ear surgery. *Saudi Med J* 2006; 27(5): 646-51.
- Habib AS, Gan TJ. Evidence-based management of postoperative nausea and vomiting: a review. *Can J Anaesth* 2004; 51(4): 326-41.
- Apfel CC, Greim CA, Haubitz I, Grundt D, Goepfert C, Sefrin P, et al. The discriminating power of a risk score for postoperative vomiting in adults undergoing

- various types of surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42(5): 502-9.
8. ASHP Therapeutic Guidelines on the Pharmacologic Management of Nausea and Vomiting in Adult and Pediatric Patients Receiving Chemotherapy or Radiation Therapy or Undergoing Surgery. *Am J Health Syst Pharm* 1999; 56(8): 729-64.
  9. Wang JJ, Ho ST, Tzeng JI, Tang CS. The effect of timing of dexamethasone administration on its efficacy as a prophylactic antiemetic for postoperative nausea and vomiting. *Anesth Analg* 2000; 91(1): 136-9.
  10. McRae RG, Weissburg AJ, Chang KW. Iatrogenic hyponatremia: a cause of death following pediatric tonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1994; 30(3): 227-32.
  11. Gayer S, Lubarsky DA. Cost-effective Antiemesis. *Int Anesthesiol Clin* 2003; 41(4): 145-64.
  12. Tramer MR. Strategies for postoperative nausea and vomiting. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18(4): 693-701.
  13. Goksu S, Kocoglu H, Bayazit YA, Yuksek S, Karci Y, Kanlikama M, et al. Antiemetic effects of granisetron, droperidol and dexamethasone in otologic surgery. *Auris Nasus Larynx* 2002; 29(3): 253-6.
  14. Kovac AL. Prevention and treatment of postoperative nausea and vomiting. *Drugs* 2000; 59(2): 213-43.
  15. Nader ND, Simpson G, Reedy RL. Middle ear pressure changes after nitrous oxide anesthesia and its effect on postoperative nausea and vomiting. *Laryngoscope* 2004; 114(5): 883-6.
  16. Naylor RJ, Inall FC. The physiology and pharmacology of postoperative nausea and vomiting. *Anaesthesia* 1994; 49(Suppl): 2-5.
  17. Safavi M, Honarmand A, Negahban M, Attari M. Prophylactic effects of intrathecal Meperidine and intravenous Ondansetron on shivering in patients undergoing lower extremity orthopedic surgery under spinal anesthesia. *J Res Pharm Pract* 2014; 3(3): 94-9.
  18. Grover VK, Mathew PJ, Hegde H. Efficacy of orally disintegrating ondansetron in preventing postoperative nausea and vomiting after laparoscopic cholecystectomy: a randomised, double-blind placebo controlled study. *Anaesthesia* 2009; 64(6): 595-600.
  19. Apfel CC, Laara E, Koivuranta M, Greim CA, Roewer N. A simplified risk score for predicting postoperative nausea and vomiting: conclusions from cross-validations between two centers. *Anesthesiology* 1999; 91(3): 693-700.
  20. Honkavaara P. Effect of ondansetron on nausea and vomiting after middle ear surgery during general anaesthesia. *Br J Anaesth* 1996; 76(2): 316-8.
  21. Russell D, Kenny GNC. 5-HT3 antagonists in postoperative nausea and vomiting. *Br J Anaesth* 1992; 69(7): 63S-8S.
  22. Naguib M, el Bakry AK, Khoshim MH, Channa AB, el GM, el GK, et al. Prophylactic antiemetic therapy with ondansetron, tropisetron, granisetron and metoclopramide in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy: a randomized, double-blind comparison with placebo. *Can J Anaesth* 1996; 43(3): 226-31.
  23. Steinbrook RA, Freiberger D, Gosnell JL, Brooks DC. Prophylactic antiemetics for laparoscopic cholecystectomy: ondansetron versus droperidol plus metoclopramide. *Anesth Analg* 1996; 83(5): 1081-3.
  24. Steinbrook RA, Gosnell JL, Freiberger D. Prophylactic antiemetics for laparoscopic cholecystectomy: a comparison of perphenazine, droperidol plus ondansetron, and droperidol plus metoclopramide. *J Clin Anesth* 1998; 10(6): 494-8.
  25. Philip BK, Pearman MH, Kovac AL, Chelly JE, Wetchler BV, McKenzie R, et al. Dolasetron for the prevention of postoperative nausea and vomiting following outpatient surgery with general anaesthesia: a randomized, placebo-controlled study. The Dolasetron PONV Prevention Study Group. *Eur J Anaesthesiol* 2000; 17(1): 23-32.
  26. Gyermek L. Pharmacology of serotonin as related to anesthesia. *J Clin Anesth* 1996; 8(5): 402-25.
  27. Sadhasivam S, Saxena A, Kathirvel S, Kannan TR, Trikha A, Mohan V. The safety and efficacy of prophylactic ondansetron in patients undergoing modified radical mastectomy. *Anesth Analg* 1999; 89(6): 1340-5.
  28. Tramer MR, Phillips C, Reynolds DJ, McQuay HJ, Moore RA. Cost-effectiveness of ondansetron for postoperative nausea and vomiting. *Anaesthesia* 1999; 54(3): 226-34.
  29. Tramer MR, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Efficacy, dose-response, and safety of ondansetron in prevention of postoperative nausea and vomiting: a quantitative systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Anesthesiology* 1997; 87(6): 1277-89.
  30. Splinter W, Noel LP, Roberts D, Rhine E, Bonn G, Clarke W. Antiemetic prophylaxis for strabismus surgery. *Can J Ophthalmol* 1994; 29(5): 224-6.
  31. Bauer KP, Dom PM, Ramirez AM, O'Flaherty JE. Preoperative intravenous midazolam: benefits beyond anxiety. *J Clin Anesth* 2004; 16(3): 177-83.
  32. Unlugenc H, Guler T, Gunes Y, Isik G. Comparative study of the antiemetic efficacy of ondansetron, propofol and midazolam in the early postoperative period. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21(1): 60-5.

## Prophylactic Antiemetic Effects of Midazolam, Ondansetron and their Combination after Middle Ear Surgery

Azim Honarmand MD<sup>1</sup>, Seyed Mohammad Reza Safavi MD<sup>1</sup>, Mansoureh Chegeni<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** The purpose of the present study was to evaluate the efficacy of midazolam-ondansetron combination in prevention of postoperative nausea and vomiting (PONV) after middle ear surgery and its comparison with using midazolam or ondansetron alone.

**Methods:** 140 patients were divided to four groups to received midazolam 0.75 mg/kg, ondansetron 4 mg, midazolam 0.75 mg/kg and ondansetron 4 mg or normal saline 0.9% (as control) intravenously just before the anesthesia. Assessment of nausea, vomiting, rescue antiemetic and side effects of study drugs such as headache and dizziness were carried out postoperatively for 24 hours.

**Findings:** The incidence of postoperative nausea and vomiting was significantly lower in midazolam-ondansetron group compared to midazolam and ondansetron groups ( $P < 0.001$ ) and there was no significant difference between the two last groups during the first 24 hours postoperatively. Need to the additional antiemetic was significantly more in the control group (71.4%) compared to other three groups; and in midazolam-ondansetron group (11.4%), it was lower than the midazolam (31.4%) and ondansetron (34.3%) groups ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** Our study showed that prophylactic administration of midazolam 0.75 mg/kg combined with ondansetron 4 mg was more effective than using midazolam or ondansetron alone in prevention of PONV after middle ear surgery.

**Keywords:** Postoperative nausea and vomiting, Middle ear surgery, Midazolam, Ondansetron

**Citation:** Honarmand A, Safavi SMR, Chegeni M. **Prophylactic Antiemetic Effects of Midazolam, Ondansetron and their Combination after Middle Ear Surgery.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2187-92

1- Professor, Department of Anesthesiology, School of Medicine AND Anesthesiology and Critical Care Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Mansoureh Chegeni, Email: mansourechegeni@yahoo.com

## مطالعه‌ی اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی (IVF) موش‌های مبتلا به آنمی همولیتیک ناشی از تزریق فنیل هیدرازین؛ بررسی اثر بهبودبخشی ژل رویال و ویتامین C

دکتر حجت عنبرآ،<sup>۱</sup> دکتر رسول شهروز<sup>۲</sup>، دکتر مزدک رازی<sup>۳</sup>، دکتر حسن ملکی‌نژاد<sup>۴</sup>، دکتر غلامرضا نجفی<sup>۵</sup>، دکتر سید رشید تونی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** آنمی همولیتیک ناشی از فنیل‌هیدرازین، که یک ترکیب همولیتیک است، می‌تواند موجب اختلال در توان باروری و اسپرماتوزن گردد. این مطالعه، به منظور ارزیابی کارایی ویتامین C و ژل رویال، که آنتی‌اکسیدان‌های کارآمدی می‌باشند، به عنوان ترکیباتی محافظ در برابر آنمی همولیتیک ناشی از فنیل‌هیدرازین صورت پذیرفت.

**روش‌ها:** موش‌های نر بالغ به صورت تصادفی به چهار گروه هشت سری تقسیم شدند. گروه اول از موش‌ها روزانه سرم فیزیولوژی با دز ۰/۱ میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه دوم فنیل‌هیدرازین با دز ۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت دریافت نمودند. گروه سوم به همراه فنیل‌هیدرازین با دز ۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در هر ۴۸ ساعت، ویتامین C با دز ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی همراه با ژل رویال با دز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از طریق دهانی به صورت روزانه دریافت کردند. گروه چهارم ویتامین C و ژل رویال را با دزهای مشابه گروه‌های قبل دریافت کردند. پس از ۳۵ روز، نمونه‌های سرمی تهیه شد؛ اسپرم‌ها از اپیدیدیم جمع‌آوری گردید و توان باروری آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** آنمی همولیتیک ناشی از فنیل‌هیدرازین، کاهش معنی‌داری در غلظت تستوسترون سرمی و در عین حال افزایش معنی‌داری در میزان اسپرم‌های با آسیب DNA و هسته‌ی نابالغ به دنبال داشت. همچنین، فنیل‌هیدرازین به شکل معنی‌داری موجب کاهش تعداد اوسیت‌های لقاح یافته، جنین‌های دو سلولی، چهار سلولی، مورولا، بلاستوسیست‌ها و همچنین، موجب افزایش جنین‌های متوقف شده گردید. حال آن‌که، تجویز ژل رویال همراه با ویتامین C به طور قابل توجهی موارد پیش‌گفته را بهبود بخشید.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد، ژل رویال و ویتامین C به عنوان مهارکننده‌های رادیکال آزاد، قادر به کاهش آسیب‌های اکسیداتیو بر اعضای تولید مثل در کم‌خونی همولیتیک ایجاد شده توسط فنیل‌هیدرازین می‌باشند.

**واژگان کلیدی:** کم‌خونی، فنیل‌هیدرازین، ژل رویال، ویتامین C، توان باروری آزمایشگاهی

**ارجاع:** عنبرآ حجت، شهروز رسول، رازی مزدک، ملکی‌نژاد حسن، نجفی غلامرضا، تونی سید رشید. مطالعه‌ی اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی (IVF)

موش‌های مبتلا به آنمی همولیتیک ناشی از تزریق فنیل‌هیدرازین؛ بررسی اثر بهبودبخشی ژل رویال و ویتامین C. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۲۰۳-۲۱۹۳

دارد. همچنین، باعث ایجاد کم‌خونی همولیتیک می‌شود. یکی از عوارض ناشی از کم‌خونی همولیتیک که کمتر مورد توجه قرار گرفته است، افزایش میزان آهن بافتی در اثر لیز شدن گلبول‌های قرمز و کاهش اکسیژن (هیپوکسی) ناشی از این نوع کم‌خونی می‌باشد. میزان آهن داخل سلولی، مثل تمامی مواد ضروری مورد نیاز سلول، به طور

#### مقدمه

بنا بر گزارش‌ها، فنیل‌هیدرازین به عنوان ماده‌ی شیمیایی قوی مطرح است که در بافت‌های مختلف و در سطوح متفاوت موجب سمیت می‌شود و اغلب در صنعت، سموم صنعتی و آفت‌کش‌ها، مواد منفجره، به عنوان تب‌بر در پزشکی، در درمان سل و فشارخون بالا کاربرد

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: رسول شهروز

Email: rasoulshahrooz1@gmail.com

هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثرات محافظتی ژل رویال و ویتامین C در جلوگیری از اثرات سوء آئمی همولیتیک القا شده با فنیل‌هیدرازین بر کیفیت برخی پارامترهای اسپرم، لقاح داخل آزمایشگاهی و میزان هورمون تستوسترون در موش‌های سوری بالغ بود.

### روش‌ها

این مطالعه به صورت یک کارآزمایی تجربی تصادفی شده‌ی شاهد دار طراحی شد و فنیل‌هیدرازین (Sigma Aldrich P6926) جهت القای کم‌خونی همولیتیک مورد استفاده قرار گرفت. ویتامین C به میزان ۵۰۰ mg/۵ ml از شرکت دارو پخش (تهران، ایران) تهیه شد. ژل رویال مورد استفاده در این مطالعه، شهریور ماه سال ۱۳۹۲ از کندوهای زنبورستان‌های شهرستان ارومیه تهیه گردید.

۶۴ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ با وزن ۲۵-۲۰ گرم از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای  $25 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $50 \pm 10$  درصد در قفس‌هایی با پوشش خاک چوب نگهداری شدند. تمام حیوانات در شرایط تغذیه‌ای یکسان با ذرت، گندم، جو و پلت به نسبت‌های برابر تغذیه شدند و امکان دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نیز برای تمامی آن‌ها وجود داشت. کلیه‌ی ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش‌ها روی حیوانات نیز بر اساس دستورالعمل‌های مصوب کمیته‌ی اخلاق دانشکده صورت پذیرفت. پس از دو هفته سازگاری با شرایط محیط، حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه ۸ سری به شکل زیر تقسیم شدند و دوره‌ی درمانی به مدت ۳۵ روز بود:

۱- گروه اول یا شاهد: حیوانات این گروه روزانه سرم فیزیولوژی به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۲- گروه دوم یا فنیل‌هیدرازین: حیوانات این گروه فنیل‌هیدرازین را به میزان ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت به منظور ایجاد کم‌خونی همولیتیک دریافت کردند (۱۸).

۳- گروه سوم: حیوانات در این گروه علاوه بر فنیل‌هیدرازین (هر ۴۸ ساعت)، ویتامین C را به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی همراه با ژل رویال به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی ۴ ساعت قبل از تجویز فنیل‌هیدرازین به طور روزانه دریافت نمودند (۲۰-۱۹).

۴- گروه چهارم: حیوانات این گروه ویتامین C را به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی همراه با ژل رویال به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم

دقیق توسط مکانیسم‌های غشای سلول و خود سلول تنظیم می‌شود و ثابت شده است که افزایش میزان این ماده در داخل و خارج از سلول، باعث ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و آسیب به چربی غشای سلول و اندامک‌های آن می‌گردد (۴-۱).

گزارش‌ها نشان می‌دهد که هیپوکسی مزمن، اسپرماتوژنز را در موش‌های صحرایی و میمون متوقف می‌کند (۵). همچنین، هیپوکسی در جوندگان نر از سنتز و آزاد شدن گونادوتروپین‌ها جلوگیری می‌کند (۷-۶). از آن جایی که فنیل‌هیدرازین به عنوان ماده‌ای مناسب برای القای این نوع کم‌خونی و مطالعه‌ی مکانیسم‌های کم‌خونی توصیف شده است (۱)، در این مطالعه این ماده به عنوان عامل ایجاد کننده‌ی کم‌خونی به کار رفت.

ویتامین C یا ال-آسکوربات ریزمغذی حیاتی برای گونه‌های پیشرفته مانند انسان، میمون و شمار اندکی از گونه‌های دیگر پستانداران به ویژه خوکچه‌ی هندی و تعدادی از گونه‌های پرندگان و برخی ماهی‌ها است. مقدار ویتامین C، یک شاخص اساسی برای تعریف ارزش تجاری میوه‌ها و سبزی‌ها می‌باشد. ویتامین C ماده‌ی جامد سفید رنگ و یکی از ویتامین‌های محلول در آب و غیر سمی و دارای استر حلقوی است و در محیط آبی هیدرولیز می‌شود و حالت اسیدی پیدا می‌کند (۹-۸). این ویتامین، در واکنش‌های شیمیایی بدن یک حمل کننده‌ی الکترون است و از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها است (۱۰) و همچنین در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و رفع استرس اکسیداتیو نقش دارد (۱۲-۱۱).

ژل رویال (Royal Jelly یا RJ) به عنوان غذای ملکه‌ی زنبورهای عسل شناخته شده است، توسط لاروهای جوان زنبور عسل و ملکه مورد استفاده قرار می‌گیرد و نقش مهمی در تغذیه‌ی ملکه دارد. این ماده از غدد زیرحلقی (Hypopharynx) و تحت فکی (Submandibular) زنبورهای کارگر جوان ترشح می‌شود. ژل رویال، ماده‌ای ژلاتینی به رنگ سفید شیری است و دارای بوی تند و مزه‌ی میوه‌ای و ارزش غذایی فراوان می‌باشد. این ژل، عامل بزرگ‌تر بودن جنه، توان باروری زیاد و بیشتر بودن طول عمر ملکه است (۱۴-۱۳). ژل رویال دارای انواع فعالیت‌های بیولوژیک در سلول‌ها و بافت‌های مختلف مدل‌های حیوانی می‌باشد و آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی و کارآمد است که عملکردی برجسته در مهار رادیکال‌های آزاد دارد (۱۵). ژل رویال، اثرات تحریکی بر اندام‌های مختلف بدن دارد و می‌تواند عملکرد آن‌ها را بهبود ببخشد (۱۶). ژل رویال، یک محرک هورمونی کمک کننده به حفظ فعالیت منظم و طبیعی متابولیسمی هورمون است و همچنین یک تقویت کننده‌ی مکمل انرژی برای تمام سنین به شمار می‌رود و در درمان مشکلات از کار افتادگی جنسی مزمن ارزشمند است (۱۷).

Aniline blue استفاده شد. اساس این آنالیز، بر این نکته استوار است که در طی مرحله‌ی اسپرمیوژنز، پروتئین به جای هیستون در کروماتین هسته قرار می‌گیرد که این جایگزینی، در تراکم و پایداری اسپرم بسیار اهمیت دارد. در این رنگ‌آمیزی، اسپرم‌های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی در آمدند و اسپرم‌های بالغ از رنگ‌پذیری کمتری برخوردار بودند. همانند روش پیش‌گفته، پس از تثبیت لام‌ها در محلول استون-اتانول و خشک شدن لام‌ها در مجاورت هوا، لام‌ها به مدت ۷ دقیقه در محلول حاوی رنگ Aniline blue قرار گرفت و پس از خشک شدن در مجاورت هوا با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ( $100\times$ ) بررسی شدند (۲۳).

بررسی توان باروری آزمایشگاهی (In-vitro fertilization) یا IVF: اسپرم‌ها با رعایت شرایط استریل به شیوه‌ی پیش‌گفته، جمع‌آوری شدند. سپس، سوسپانسیون حاوی اسپرم‌ها به مدت ۵ ساعت جهت ظرفیت‌یابی در انکوباتور  $CO_2$  با غلظت ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

به ازای هر موش نر، تعداد سه موش ماده جهت گرفتن اووسیت بالغ تحت تحریک تخمدانی قرار گرفتند. موش‌های ماده ابتدا  $7/5$  واحد Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (ساخت شرکت Folligon کشور هلند) از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و پس از گذشت ۴۸-۴۶ ساعت،  $7/5$  واحد هورمون HCG (ساخت شرکت Human corionic gonadotropin) (ساخت شرکت Folligon کشور هلند) به روش تزریق داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد (۲۴).

عصر روز قبل از انجام IVF، محیط کشت لازم در داخل انکوباتور با غلظت  $CO_2$  به میزان ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. برای هر کدام از گروه‌ها، دیش‌های مجزایی در نظر گرفته شد. دیش‌های لقاح با محیط کشت HTF که با ۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر BSA (Bovine serum albumin) از شرکت Sigma ترکیب شده بود، قطره‌گذاری شد. یک قطره‌ی ۵۰۰ میکرولیتری در هر دیش برای لقاح و چندین قطره‌ی ۱۰۰ میکرولیتری برای شستشو در دیش‌های IVF گذاشته شدند و روی آن‌ها با روغن معدنی (Mineral oil, Sigma) پوشانده شد.

از سوی دیگر، تخمک‌ها بعد از گذشت ۱۳ ساعت از تزریق HCG، با استفاده از روش شکافتن (Dissecting) از ناحیه‌ی آمپول اویدوکت جمع‌آوری شدند (۲۵) و پس از شستشو با محیط HTF، به قطرات لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF که با ۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر BSA ترکیب شده بود، انتقال یافتند.

اسپرم‌های ظرفیت‌یابی شده به میزان  $1 \times 10^6$  عدد به قطره‌ی محیط کشت حاوی تخمک‌های شستشو یافته انتقال داده شدند. عمل لقاح حدود ۶ ساعت پس از اضافه کردن اسپرم‌ها با مشاهده‌ی دو

وزن بدن به صورت خوراکی به طور روزانه دریافت کردند.

تمامی موش‌های موجود در چهار گروه ذکر شده، ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، آسان‌کشی شدند. سپس، وزن بدن و بیضه‌ی حیوانات با استفاده از ترازوی دقیق آزمایشگاهی (در حد میلی‌گرم) اندازه‌گیری شد و نمونه‌های خون توسط سرنگ‌های استریل به صورت مستقیم از قلب جمع‌آوری گردید. جهت تهیه‌ی سرم، نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم‌ها تا زمان سنجش هورمونی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. برای سنجش تستوسترون، روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) و رادیوایمونوتری با استفاده از کیت اختصاصی (Diaplus Inc. USA) انجام و گروه‌ها با هم مقایسه شدند.

نحوه‌ی تهیه‌ی اسپرم از اپیدیدیم: به منظور ارزیابی کیفیت اسپرم، ابتدا اپیدیدیم زیر لوپ با بزرگ‌نمایی ۲۰ برابر از بافت بیضه جدا گشت و بافت‌های اطراف آن تمیز گردید. بلافاصله دم اپیدیدیم درون پتری دیش‌های حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت Human tubal fluid (HTF) قرار گرفت. به منظور جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی و آسیب به اسپرم‌ها، تمام وسایل مورد استفاده و محیط کشت قبل از مصرف در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس دم اپیدیدیم در داخل محیط کشت به قطعات کوچک خرد شد و به مدت ۲۰ دقیقه در درون محیط کشت در انکوباتور باقی ماند تا امکان خروج اسپرم‌ها از اپیدیدیم فراهم آید. در نهایت، سوسپانسیون حاوی اسپرم با استفاده از محیط کشت به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق گردید.

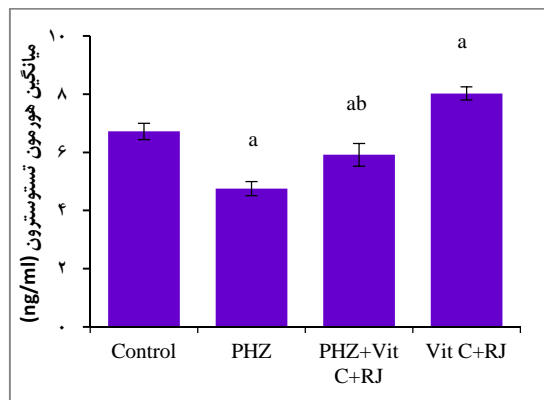
ارزیابی میزان آسیب رشته‌ی DNA: برای ارزیابی هر گونه شکستگی در دو رشته‌ی DNA مربوط به اسپرم موش‌ها، رنگ‌آمیزی Acridine orange انجام گرفت. در صورتی که DNA اسپرم دچار شکستگی شده باشد، به دنبال رنگ‌آمیزی، DNA در طیفی از رنگ زرد تا قرمز فلوئورسنت بستگی به میزان آسیب، نمایان می‌شود. DNA سالم به رنگ سبز دیده می‌شود. در این روش، پس از سه بار شستشوی نمونه‌ی اسپرم با بافر Phosphate buffer solution (PBS) و حذف مایع رویی، رسوب حاصل به کمک بافر PBS به غلظت نهایی رسانده شد. اسپرم‌های مورد نظر از محیط کشت حاوی اسپرم تهیه شد و پس از خشک شدن آن در محیط آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه در داخل ظرف حاوی استون-اتانول به نسبت ۱ به ۱ قرار گرفت. پس از خشک شدن لام‌ها در مجاورت هوا، این لام‌ها به مدت ۷ دقیقه در ظرف حاوی محلول رنگ Acridine orange قرار گرفت و پس از خشک شدن نهایی توسط میکروسکوپ فلوئورسنت و عدسی  $100\times$  با فیلتر ۴۶۰ نانومتر بررسی شد (۲۱) و نتایج حاصل به صورت درصد بیان گردید (۲۲).

ارزیابی بلوغ هسته‌ی اسپرم: برای این منظور، از رنگ‌آمیزی



اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده در نظر گرفته شد. بررسی‌های حاصل از رنگ‌آمیزی Acridine orange نشان داد که درصد اسپرم‌هایی که DNA آسیب دیده داشتند، در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی به طور قابل توجهی افزایش داشت و با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). آسیب DNA اسپرم در گروه دریافت‌کننده ویتامین C و ژل رویال، همراه با فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کاهش یافت؛ در حالی که این گروه با گروه شاهد هم دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

هیچ گونه اختلاف آماری معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بین گروه دریافت‌کننده ویتامین C و ژل رویال بدون فنیل‌هیدرازین با گروه شاهد مشاهده نشد؛ اما این گروه با گروه فنیل‌هیدرازین دارای اختلاف معنی‌داری بود (شکل‌های ۲ و ۳-A).



شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف

PHZ: فنیل‌هیدرازین، Vit C: ویتامین C، RJ: ژل رویال، Control: شاهد، ng/ml: نانوگرم بر میلی‌لیتر

داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

a: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ( $P < 0/05$ ); b: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه فنیل‌هیدرازین ( $P < 0/05$ )

### ارزیابی میانگین تعداد اسپرم‌های بالغ و نابالغ

ارزیابی میانگین درصد اسپرم‌های با هسته‌ی نابالغ نشان داد که درصد اسپرماتوزوئیدهای با هسته‌ی نابالغ در گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). میانگین درصد اسپرم‌های نابالغ در گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین به طور معنی‌داری نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین کاهش یافت؛ در حالی که این گروه، با گروه شاهد هم دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). همچنین، در گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین C و ژل رویال بدون فنیل‌هیدرازین، میانگین درصد اسپرم‌های نابالغ همانند گروه شاهد بود و با این گروه، فاقد اختلاف

پیش‌هسته‌ی نر و ماده زیر میکروسکوپ اینورت مشخص گردید. تخمک‌های لقاح یافته شستشو داده شده و به محیط کشت تازه تهیه شده، منتقل گردید.

به منظور ارزیابی مراحل رشد زیگوت نیز از میکروسکوپ اینورت استفاده شد. درصد جنین‌های دو سلولی، درصد جنین‌های چهار سلولی، درصد جنین‌های مرحله‌ی مورولا، درصد جنین‌های متوقف شده (Arrested embryos) و درصد بلاستوسیت‌ها در طی ۱۲۰ ساعت بعد از لقاح در هر گروه مورد بررسی قرار گرفتند (۲۶).

جنین‌های قطعه قطعه شده یا لیز شده که توسعه نیافته و کامل نشده‌اند، جنین‌های متوقف شده نام دارند. میزان سلول‌های لیز شده به صورت زیر در نظر گرفته شد: جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۱ که به طور کامل لیز شده، نکروز شده و یا قطعه قطعه شدند. جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۲ که شامل بلاستومرهای بودند که تا حدودی لیز یا قطعه قطعه شدند و جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۳ که شامل جنین‌هایی بودند که دارای تعدادی بلاستومر لیز یا قطعه قطعه شده و یا دارای وزیکول‌های سیتوپلاسمی بودند (۲۷).

داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد ارزیابی آماری قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شد. جهت مقایسه‌ی بین گروه‌ها، آزمون‌های One-way ANOVA و Tukey مورد استفاده قرار گرفت و مقدار  $P < 0/05$  برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### ارزیابی حاصل از سنجش هورمون تستوسترون

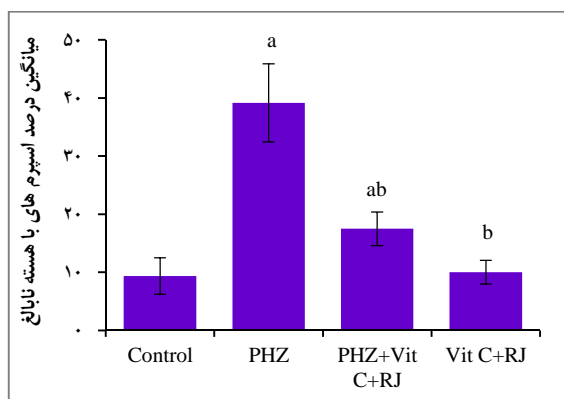
بررسی میزان هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف نشان داد که میزان این هورمون در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. در گروه ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین، سطح این هورمون نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین به طور معنی‌دار افزایش نشان داد، اما این افزایش به اندازه‌ی گروه شاهد نبود و با آن دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). در گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین C و ژل رویال بدون فنیل‌هیدرازین، سطح هورمون تستوسترون بیش از گروه شاهد بود و با هر دو گروه شاهد و فنیل‌هیدرازین اختلاف معنی‌دار نشان داد (شکل ۱).

#### ارزیابی آسیب DNA/اسپرم

میانگین تعداد اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده به صورت درصد مورد شمارش قرار گرفت. اسپرم‌های با هسته‌ی سبز رنگ طبیعی بودند، اما هسته‌ی نارنجی تا قرمز بسته به میزان آسیب DNA به عنوان

گروه‌های مختلف نشان داد که میانگین سلول‌های تخم حاصل از اسپرم‌های اپیدیدیم در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ).

در حالی که استفاده از ویتامین C و ژل رویال به همراه فنیل‌هیدرازین، میانگین درصد لقاح را نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین به طور معنی‌دار افزایش داد و با گروه شاهد نیز دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). همچنین، استفاده از ویتامین C و ژل رویال به تنهایی و بدون فنیل‌هیدرازین، میانگین درصد لقاح را نسبت به گروه شاهد افزایش داد و با این گروه، فاقد اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۱).



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین درصد اسپرم‌های دارای هسته‌ی نابالغ در گروه‌های مختلف

PHZ: فنیل‌هیدرازین، Vit C: ویتامین C، RJ: ژل رویال، Con: شاهد، ng/ml: نانوگرم بر میلی‌لیتر

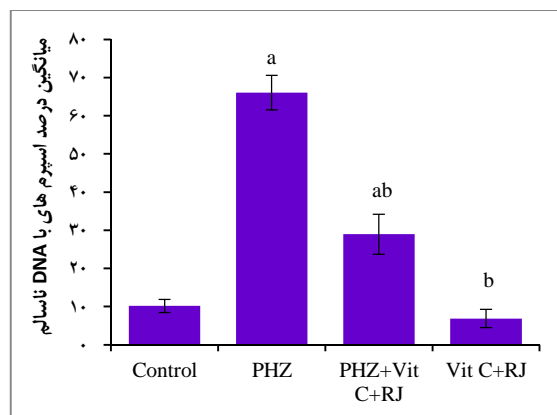
داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

a: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ( $P < 0/05$ )

b: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه فنیل‌هیدرازین ( $P < 0/05$ )

از سلول‌های تخم حاصل از تخمک‌های بارور شده توسط اسپرم‌های اپیدیدیم، جنین‌های دو سلولی و سپس چهار سلولی به وجود آمد (شکل ۵). مقایسه‌ی گروه‌های آزمایشی نشان داد که میانگین جنین‌های دو و چهار سلولی به وجود آمده در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). اما در مقایسه‌ی میانگین جنین‌های دو و چهار سلولی می‌توان بیان نمود که تجویز ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین، سطوح این شاخص‌ها را به صورت معنی‌داری به سمت مقادیر مشاهده شده در گروه شاهد سوق داد و با گروه فنیل‌هیدرازین نیز اختلاف معنی‌دار نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین، گروه ویتامین C و ژل رویال بدون فنیل‌هیدرازین دارای اختلاف معنی‌داری در این شاخص‌ها با گروه فنیل‌هیدرازین بود (جدول ۱).

معنی‌دار بود؛ در حالی که این گروه با گروه فنیل‌هیدرازین دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ) (شکل‌های ۳-B و ۴).



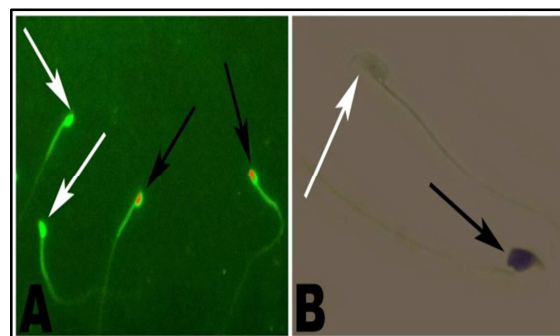
شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین درصد اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده در گروه‌های مختلف

PHZ: فنیل‌هیدرازین، Vit C: ویتامین C، RJ: ژل رویال، Control: شاهد

داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

a: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ( $P < 0/05$ )

b: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه فنیل‌هیدرازین ( $P < 0/05$ )



شکل ۳. تصاویر مربوط به رنگ‌آمیزی اسپرم با Acridine orange (A) و Aniline blue (قسمت B).

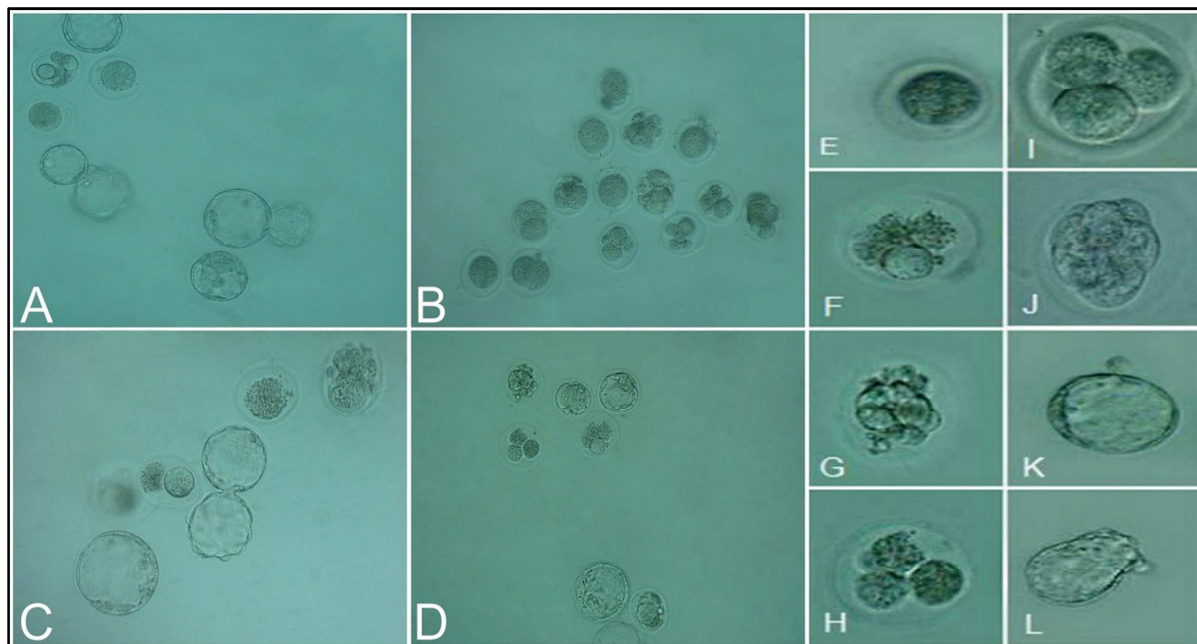
A: نمای ریزبینی اسپرم رنگ‌آمیزی شده با Acridine orange در میکروسکوپ فلوروسنت (درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر)، اسپرم دارای DNA سالم (فلش سفید رنگ)، اسپرم دارای DNA آسیب دیده (فلش سیاه رنگ).

B: نمای ریزبینی اسپرم رنگ‌آمیزی شده با Aniline blue (درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر)، اسپرم دارای هسته‌ی بالغ با سری به رنگ آبی کم رنگ (فلش سفید رنگ) و اسپرم دارای هسته‌ی نابالغ با سری به رنگ آبی پررنگ (فلش سیاه رنگ).

### ارزیابی توان باروری آزمایشگاهی، درصد لقاح و رشد جنینی در گروه‌های آزمایشی

پس از جمع‌آوری تخمک‌ها از موش‌های ماده، تخمک‌های بارور شده توسط اسپرم‌های ظرفیت یافته سلول تخم را به وجود آوردند (شکل ۵). مقایسه‌ی میانگین درصد لقاح و تشکیل سلول تخم در





شکل ۵. نمای میکروسکوپی از جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی اسپرم‌های گروه‌های مختلف

جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی اسپرم‌های گروه شاهد (A)، گروه فنیل‌هیدرازین با کم‌خونی همولیتیک (B)، گروه فنیل‌هیدرازین همراه با ویتامین C و ژل رویال (C) و گروه ویتامین C و ژل رویال به تنهایی (D)، جنین‌های بارور نشده (E)، جنین‌های متوقف شده نوع ۱ (F)، جنین‌های متوقف شده نوع ۲ (G)، جنین‌های متوقف شده نوع ۳ (H)، جنین‌های چهار سلولی سالم و طبیعی (I)، مورولای سالم و طبیعی (J)، بلاستوسیست سالم و طبیعی (K)، جنین‌های Hatch شده (L).

نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). جنین‌های دو و چهار سلولی در راستای کشت در آزمایشگاه به جنین‌های مرحله‌ی بلاستوسیست تبدیل شدند (شکل ۵). بر اساس مقایسه‌ی میانگین درصد جنین‌های مرحله‌ی بلاستوسیست مشخص شد که آنمی همولیتیک حاصل از تزریق فنیل‌هیدرازین در گروه فنیل‌هیدرازین، سبب کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد جنین‌های مرحله‌ی بلاستوسیست نسبت به گروه شاهد شد ( $P < 0/05$ ).

از بین جنین‌های دو و چهار سلولی به دست آمده از سلول‌های تخم، تعدادی به مرحله‌ی مورولا رسید. جدول ۱، درصد جنین‌های مرحله‌ی مورولای حاصل از جنین‌های چهار سلولی را در گروه‌های مختلف مقایسه می‌کند. درصد جنین‌های مرحله‌ی مورولا در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین، درصد جنین‌های مرحله‌ی مورولا در گروهی که ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین دریافت کردند،

جدول ۱. میانگین نتایج حاصل از بررسی لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنین در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه	شاهد	فنیل‌هیدرازین	فنیل‌هیدرازین + ویتامین C + ژل رویال	ویتامین C + ژل رویال
لقاح (درصد)	۹۲/۲۶ ± ۱/۲۷	<sup>a</sup> ۵۸/۹۷ ± ۰/۴۰	<sup>ab</sup> ۷۱/۱۵ ± ۱/۶۵	<sup>b</sup> ۹۳/۸۹ ± ۱/۰۲
جنین‌های دو سلولی (درصد)	۹۲/۶۸ ± ۱/۳۱	<sup>a</sup> ۵۶/۸۹ ± ۱/۶۳	<sup>ab</sup> ۷۲/۶۵ ± ۱/۴۸	<sup>b</sup> ۹۳/۴۴ ± ۱/۲۳
جنین‌های چهار سلولی (درصد)	۸۵/۱۲ ± ۲/۱۱	<sup>a</sup> ۵۹/۸۲ ± ۲/۶۸	<sup>ab</sup> ۷۴/۹۱ ± ۰/۸۵	<sup>b</sup> ۸۶/۵۸ ± ۳/۵۶
جنین‌های مرحله‌ی مورولا (درصد)	۸۴/۷۲ ± ۰/۶۳	<sup>a</sup> ۵۹/۱۶ ± ۰/۸۳	<sup>ab</sup> ۷۰/۱۵ ± ۳/۲۱	<sup>b</sup> ۸۳/۳۶ ± ۰/۶۲
جنین‌های مرحله‌ی بلاستوسیست (درصد)	۷۷/۸۳ ± ۲/۱۶	<sup>a</sup> ۴۳/۶۴ ± ۰/۷۹	<sup>ab</sup> ۶۴/۳۰ ± ۳/۳۳	<sup>b</sup> ۷۶/۱۳ ± ۰/۴۸
جنین‌های متوقف شده (درصد)	۲۲/۱۶ ± ۲/۷۴	<sup>a</sup> ۵۶/۳۵ ± ۱/۸۹	<sup>ab</sup> ۳۵/۶۹ ± ۳/۱۶	<sup>b</sup> ۲۳/۸۶ ± ۲/۴۸
جنین‌های متوقف شده نوع ۱ (درصد)	۱/۵۶ ± ۰/۷۷	<sup>a</sup> ۷/۱۲ ± ۲/۰۲	<sup>b</sup> ۲/۴۵ ± ۱/۳۲	<sup>b</sup> ۴/۲۸ ± ۲/۱۲
جنین‌های متوقف شده نوع ۲ (درصد)	۶/۴۴ ± ۲/۰۴	<sup>a</sup> ۱۵/۰۸ ± ۲/۵۲	<sup>b</sup> ۸/۹۲ ± ۳/۶۶	<sup>b</sup> ۷/۳۰ ± ۲/۹۶
جنین‌های متوقف شده نوع ۳ (درصد)	۱۴/۱۶ ± ۲/۵۳	<sup>a</sup> ۳۴/۱۵ ± ۳/۸۶	<sup>ab</sup> ۲۴/۳۲ ± ۳/۹۴	<sup>b</sup> ۱۲/۲۸ ± ۳/۱۴

داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

a: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ( $P < 0/05$ ); b: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه فنیل‌هیدرازین ( $P < 0/05$ )

## بحث

کم‌خونی یک اختلال خونی شایع در مهره‌داران می‌باشد که توسط عوامل متعددی ایجاد می‌گردد که مسمومیت‌های دارویی یکی از آن‌ها است (۲۸). هیپوکسی ناشی از کم‌خونی باعث کاهش وزن بدن و اندام‌ها، افزایش ناهنجاری‌ها و تغییر فراسنجه‌های سرمی می‌گردد (۲۹). نشان داده شده است که کم‌خونی همولیتیک از دو طریق می‌تواند اثرات خود را اعمال نماید، اول کاهش اکسیژن‌رسانی و دوم تنش اکسیداتیو که به دنبال افزایش آهن خون و بافت‌ها به وجود خواهد آمد. کم‌خونی همولیتیک و لیز شدن گلبول‌های قرمز خون، موجب کاهش ظرفیت انتقال اکسیژن و افزایش میزان آهن خون می‌گردد که این امر به نوبه‌ی خود پایه‌گذار تغییراتی در بدن می‌شود (۳-۴).

همچنین، مشخص شده است که افزایش آهن بافتی، از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو باعث آسیب شدید غشای سلول، پروتئین‌ها و DNA می‌شود. همان گونه که در مطالعه‌ی حاضر نیز مشاهده گردید، به نظر می‌رسد که تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل‌هیدرازین، موجب کاهش فراسنجه‌ی سرمی شود؛ به طوری که کاهش معنی‌داری در میزان هورمون تستوسترون در گروه فنیل‌هیدرازین مشاهده شد؛ این کاهش در نتیجه‌ی تنش اکسیداتیو، با مطالعات قبلی قابل توجیه است (۳۱-۳۰).

تستوسترون، به عنوان مهم‌ترین هورمون آندروژن، در تکامل و تکثیر سلول‌های زایا و تمایز اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای کشیده، نقش اساسی ایفا می‌کند (۳۲) و همچنین، عملکرد جنسی را حمایت می‌نماید. در واقع، سلامت سلول‌های زایا و توانایی آن‌ها برای انجام تقسیمات میتوزی در لوله‌های منی‌ساز، به ترشح هورمون تستوسترون توسط سلول‌های لیدینگ وابسته می‌باشد (۳۳). بنا بر این، اختلال در بیوستز تستوسترون در سلول‌های لیدینگ می‌تواند اثرات مضر روی باروری جنس نر داشته باشد (۳۴). مکانیسم عمل فنیل‌هیدرازین همچنین ممکن است به دلیل اثر آن روی سلول‌های لیدینگ باشد که منجر به کاهش سطح تستوسترون می‌شود (۳۵).

با آتروفی سلول‌های لیدینگ، میزان سنتز و ترشح تستوسترون کاهش می‌یابد که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مبنی بر کاهش معنی‌دار سطح سرمی تستوسترون در گروه فنیل‌هیدرازین، مطابقت دارد. در یک بررسی بالینی، نشان داده شد که ژل رویال دارای خواص درمانی در مقابل آسیب‌های بافتی و سرمی حاصل از بلئومایسین می‌باشد (۳۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز ویتامین C و ژل رویال با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی توانستند آسیب‌های بافتی و سرمی ناشی از فنیل‌هیدرازین را تا حدودی تعدیل نمایند که این نتایج، با یافته‌های Silici و همکاران در مورد نقش محافظتی ژل رویال در برابر سیس پلاتین که دارای خواص اکسیدانی مشابه فنیل‌هیدرازین است (۲۰)، مطابقت دارد. همچنین، نشان داده شده است که ژل رویال قادر است کاهش

همچنین، میانگین درصد جنین‌های مرحله‌ی بلاستوسیست در گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین، افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). در مقایسه‌ی میانگین جنین‌های مرحله‌ی بلاستوسیست این گروه با گروه شاهد نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱).

از بین سلول‌های تخم به دست آمده، تعدادی در مراحل مختلف دچار توقف رشد شدند. جدول ۱، درصد جنین‌های متوقف شده را در گروه‌های مختلف مقایسه می‌کند. درصد جنین‌های متوقف شده در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین، درصد جنین‌های متوقف شده در گروهی که ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین دریافت کردند، نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). اگر چه تجویز ویتامین C و ژل رویال بدون فنیل‌هیدرازین نیز افزایش بسیار اندکی را در این شاخص در مقایسه با گروه شاهد موجب گشت، اما این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود.

همان گونه که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۱ در گروه‌های مختلف مورد مطالعه مقایسه شد. درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۱ در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۱ در گروهی که همراه با فنیل‌هیدرازین، ویتامین C و ژل رویال نیز دریافت کردند، نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ).

در جدول ۱، مقایسه‌ی درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۲ در حاکی از افزایش معنی‌دار جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۲ در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه شاهد است ( $P < 0/05$ ). به علاوه، درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۲ در گروهی که ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین دریافت کردند، نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین، کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ).

در نهایت، مقایسه‌ی درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۳ در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۳ در گروه فنیل‌هیدرازین دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بود ( $P < 0/05$ ). همچنین، درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۳ در گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین C و ژل رویال همراه با فنیل‌هیدرازین، دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به هر دو گروه شاهد و فنیل‌هیدرازین بود ( $P < 0/05$ )؛ اما گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین C و ژل رویال بدون فنیل‌هیدرازین با وجود کاهش درصد جنین‌های متوقف شده‌ی نوع ۳ نسبت به گروه شاهد، با این گروه فاقد اختلاف معنی‌دار بود و فقط نسبت به گروه فنیل‌هیدرازین اختلاف معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نشان داد (شکل ۵، جدول ۱).

سطح تخمک، و در نهایت، ناباروری در جنس نر می‌شود (۴۳). در بررسی اسپرم با روش رنگ‌آمیزی Acridine orange، افزایش قابل توجه میزان اسپرم‌های با DNA آسیب دیده در گروه مبتلا به کم‌خونی همولیتیک نسبت به گروه‌های شاهد و دریافت کننده ژل رویال و ویتامین C، به دلیل کاهش میزان پروتامیناسیون هسته قابل توجه است. کاهش پروتامیناسیون، باعث اختلال در روند فشرده‌گی هسته می‌شود و احتمال تماس عوامل مضر خارجی از قبیل رادیکال‌های آزاد با DNA سلولی اسپرم را افزایش می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهند که توان باروری، تکوین جنین و به دنبال آن میزان بارداری، به سلامت DNA اسپرم بستگی دارد (۴۴). عامل مهمی که می‌تواند موجب تخریب هسته‌ی اسپرم شود، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کمبود آنتی‌اکسیدان است (۴۵)؛ این اثر نیز وابسته به تزریق فنیل‌هیدرازین است و ویتامین C و ژل رویال، از آن جلوگیری و یا آن را تعدیل نمود. بر اساس مطالعات انجام شده، استرس اکسیداتیو دارای اثرات تخریبی بر روی توان باروری آزمایشگاهی و تکوین جنین است و آنتی‌اکسیدان‌ها قادر به بهبود این اثرات می‌باشند (۴۶، ۱۸). همان‌طور که گفته شد، یکی از علل کاهش چشمگیر در میزان تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی، تولید رادیکال آزاد می‌باشد که تصور می‌شود این عامل، در توقف تقسیم میوزی اووسیت، توقف رشد جنین و مرگ سلول دخالت داشته باشد (۴۸-۴۷). رادیکال‌های تولید شده توسط اسپرماتوزوئید آسیب دیده با کیفیت مایع منی و نیز توان باروری اسپرم در شرایط آزمایشگاهی ارتباط عکس دارد (۴۹). در مطالعه‌ی حاضر نیز آنتی‌همولیتیک حاصل از تزریق فنیل‌هیدرازین با تولید رادیکال آزاد، باعث اعمال اثرات منفی بر توان باروری آزمایشگاهی شد و کاهش درصد لقاح، کاهش درصد جنین‌های دو سلولی و جنین‌های تبدیل شده به بلاستوسیست و کیفیت پایین بلاستوسیست‌ها را سبب گردید و نیز باعث افزایش جنین‌های متوقف شده در توان باروری آزمایشگاهی شد. از سوی دیگر، در یک مطالعه‌ی بالینی بر روی موش‌های مبتلا به آنتی‌همولیتیک، این آنتی‌همولیتیک باعث کاهش اکثر فراسنجه‌های مربوط به توان باروری آزمایشگاهی شده بود که در آن جا، کروموسوم تحت عنوان آنتی‌اکسیدان توانست تا حدودی این کاهش در توان باروری آزمایشگاهی را جبران نماید (۱۸). این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، به طور کامل همخوانی دارد. در این جا نیز ویتامین C و ژل رویال، با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی توانستند نقش محافظتی خود را در مقابل آنتی‌همولیتیک حاصل از تزریق فنیل‌هیدرازین به خوبی ایفا نمایند و این کاهش در فراسنجه‌های مربوط به توان باروری آزمایشگاهی را تا حدود زیادی بهبود دهند و در مواردی، باعث تعدیل در آنها شوند.

تستوسترون سرمی در موش‌های مبتلا به دیابت شده با استفاده از استریوتوزوسین را تا میزان زیادی جبران و آن را تعدیل نماید (۳۰). در مطالعه‌ی حاضر، پارامترهای مورد بررسی مربوط به کیفیت اسپرم تحت تأثیر استرس اکسیداتیو القا شده توسط فنیل‌هیدرازین مختل شدند که پیرو مطالعات قبلی، نشان داده شد که هیپوکسی به طور بارز موجب کاهش اسپرماتوزن از طریق محور هیپوفیزی-بیضه‌ای می‌گردد (۳۷). همچنین، در این مطالعه نشان داده شد که تجویز هم‌زمان فنیل‌هیدرازین، ژل رویال و ویتامین C، موجب بهبود در کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه فنیل‌هیدرازین تنها گردید. این یافته‌ها، نقش آنتی‌اکسیدانی و محافظتی ژل رویال و ویتامین C را به اثبات می‌رساند که با نتایج مطالعات دیگران در مورد نقش محافظتی ژل رویال و ویتامین C بر روی کیفیت اسپرم به طور کامل منطبق است (۳۸، ۳۰). در مرحله‌ی اسپرم‌یوزن، متراکم شدن هسته از طریق جایگزینی پروتامین به جای هیستون صورت می‌گیرد. در این مرحله، بیوسنتز چربی‌ها دارای اهمیت بالایی می‌باشد (۳۹). مطالعه‌ی حاضر نشان داد، در گروهی که فنیل‌هیدرازین به تنهایی تجویز شده بود، درصد اسپرم‌های با هسته‌ی نابالغ و یا با DNA آسیب دیده افزایش یافت؛ که این افزایش می‌تواند به علت اختلال در بیوسنتز چربی‌ها اتفاق بیفتد (۴۰). از سوی دیگر، مطالعات پیشین نشان داده است که آنتی‌همولیتیک حاصل از دز بالای فنیل‌هیدرازین، باعث کاهش کیفیت اسپرم مانند افزایش درصد اسپرم‌های با هسته‌ی نابالغ و DNA آسیب دیده گردیده است که این امر، با یافته‌های حاصل از ارزیابی‌های مربوط به کیفیت اسپرم در مطالعه‌ی حاضر نیز همخوانی دارد (۴۱). در ساختمان مولکولی DNA سلول‌های بدن از جمله اسپرم، رادیکال‌های آزاد می‌توانند موجب اکسیداسیون بازهای پورین و پیریمیدین، ایجاد شکستگی در یک یا دو رشته، ایجاد جایگاه‌های بدون باز، تشکیل پل‌های عرضی بین DNA و پروتئین و تغییر در قند دزاکسی ریبوز شوند. رادیکال‌های آزاد، قادر هستند که مولکول‌های زیستی حیاتی از جمله DNA را مورد حمله‌ی اکسیداتیو قرار دهند و تغییراتی در ساختمان DNA ایجاد نمایند. این تغییرات در DNA اسپرم، می‌تواند موجب ناباروری شود. یکی از علل مهم ناباروری در جنس نر، وجود رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال می‌باشد که باعث اکسیداسیون DNA اسپرم و تغییر بازهای آلی در ساختمان DNA می‌گردد و در نهایت، موجب تخریب اسپرم یا کاهش قدرت حرکتی و کاهش توان باروری می‌شود (۴۲، ۲۷). سایر مطالعات نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد از دو منبع متفاوت سلول‌های اسپرماتوزوئید آسیب دیده و گلبول‌های سفید فعال در مایع اسپرمی تولید می‌شوند. از این رو، مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد، موجب اختلال در ساختار DNA، کاهش توان باروری و عدم اتصال اسپرم به

آزاد، قادر به بهبود اثرات نامطلوب فنیل هیدرازین بر کیفیت اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی در موش می‌باشد. با این وجود، تأیید کارایی درمانی ویتامین C و ژل رویال در موارد بالینی کم‌خونی انسانی، مستلزم مطالعات گسترده‌تری است.

### تشکر و قدردانی

در پایان از تمام کسانی که در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد بافت‌شناسی دانشگاه ارومیه به شماره‌ی ۱۱۷-۲ می‌باشد. نگارندگان از بخش بافت‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

در مطالعه‌ی شالیزار و همکاران، نقش محافظتی ژل رویال در توان باروری آزمایشگاهی در موش‌های تحت درمان با داروی استانوزولول به اثبات رسید (۴۶). همچنین، مطالعات نشان داده است که ویتامین C قادر است توان باروری آزمایشگاهی در گاو را بهبود بخشد و باعث بهبود روند توان باروری آزمایشگاهی در موارد دیگر گردد (۵۲-۵۰).

با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، چنین بر می‌آید که فنیل هیدرازین به واسطه‌ی افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، پی‌ریزی تنش‌های اکسیداتیو و نیز تضعیف دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدان بدن، موجب کاهش کیفیت اسپرم و کاهش توان باروری آزمایشگاهی می‌گردد. حال آن که ویتامین C و ژل رویال به جهت دارا بودن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه و در نتیجه مهار رادیکال‌های

### References

- Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed* 2007; 5(3): 125-30.
- Puntarulo S. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med* 2005; 26(4-5): 299-312.
- Ferrali M, Ciccoli L, Signorini C, Comporti M. Iron release and erythrocyte damage in allyl alcohol intoxication in mice. *Biochem Pharmacol* 1990; 40(7): 1485-90.
- Friedmann B, Jost J, Rating T, Weller E, Werle E, Eckardt KU, et al. Effects of iron supplementation on total body hemoglobin during endurance training at moderate altitude. *Int J Sports Med* 1999; 20(2): 78-85.
- Macome JC, Costa LE, Martin IH, Taquini AC. Steroid biosynthesis by gonads of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Acta Physiol Lat Am* 1977; 27(5): 249-57.
- Khmel'nitskii OK, Tararak TI. Morphological characteristics of the pituitary-gonad system in high altitude hypoxia. *Biull Eksp Biol Med* 1991; 111(4): 432-6. [In Russian].
- Rattner BA, Macmillan BT, Michael SD, Altland PD. Plasma gonadotrophins, prolactin and corticosterone concentrations in male mice exposed to high altitude. *J Reprod Fertil* 1980; 60(2): 431-6.
- McCluskey ES. Which vertebrates make vitamin C? *Origins* 1985; 12(2): 96-100.
- du Toit R, Volsteed Y, Apostolides Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 2001; 166(1-2): 63-9.
- Siddique YH, Beg T, Afzal M. Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megestrol acetate-induced genotoxicity in mice. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24(3): 121-7.
- Aly N, EL-Gendy K, Mahmoud F, El-Sebae AK. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pest Biochem Physiol* 2010; 97(1): 7-12.
- Taghiyar M, Ghiasvand R, Feizi A, Askari Gh, Shokri N. Effects of vitamins C and E supplementation on muscle damage and oxidative stress in female athletes: a double-blind clinical trial. *J Isfahan Med Sch* 2013; 30(216): 2113-24. [In Persian].
- Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Foods* 2012; 4(1): 39-52.
- Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med* 2009; 9: 4.
- Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian AA. Effect of royal jelly on improving passive avoidance learning and spatial learning and memory in rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2012; 20(2): 211-9. [In Persian].
- Shirzad H, Sedaghat A, Ghasemi S, Shirzad M. Effect of royal jelly on sterile wound healing in Balb/C mice. *Armaghane-Danesh* 2010; 15(1): 38-46. [In Persian].
- Yang A, Zhou M, Zhang L, Xie G, Chen H, Liu Z, et al. Influence of royal jelly on the reproductive function of puberty male rats. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(6): 1834-40.
- Kalantari Hesari A, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Saboory E. Crocin prevention of anemia-induced changes in structural and functional parameters of mice testes. *J Appl Biomed* 2015; 13(3): 213-23.
- Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 59(6): 415-23.
- Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A. Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology* 2009; 74(3): 545-51.
- Sadeghi MR, Akhondi MA, Savadi Shirazi E, Hodjat M, Amirjanati N, Akhondi MA, et al. The comparison of four different sperm chromatin assays and their correlation with semen parameters. *Tehran Univ Med J* 2008; 65(Suppl 3): 33-41. [In Persian].
- Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal

- spermatozoa in rat. *Alcohol* 2011; 45(4): 403-9.
23. Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, et al. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. *Avicenna J Med Biotechnol* 2009; 1(3): 173-80.
  24. Byers SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology* 2006; 65(9): 1716-26.
  25. Ikeda T, Sofikitis N. Bilateral testicular consequences in the unilateral vasectomy of immature rats. *Yonago Acta Medica* 2000; 43(1): 1-9.
  26. Cebal E, Carrasco I, Vantman D, Smith R. Preimplantation embryotoxicity after mouse embryo exposition to reactive oxygen species. *Biocell* 2007; 31(1): 51-9.
  27. Zahra A, Gholamreza N, Farokhi F, Shalzar JA. Attenuation of cyclosporine-induced sperm impairment and embryotoxicity by crataegus monogyna fruit aqueous extract. *Cell J* 2013; 15(3): 198-205.
  28. Roque M, D'Anna C, Gatti Ch, Veuthey T. Hematological and morphological analysis of the erythropoietic regenerative response in phenylhydrazine-induced hemolytic anemia in mice. *Scand J Lab Anim Sci* 2008; 35(3): 181-90.
  29. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1996.
  30. Ghanbari E, Nejati V, Najafi G, Khazaei M, Babaei M. Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Fertil Steril* 2015; 9(1): 113-20.
  31. Mohammadi J, Chatroz B, Delaviz H. The effect of hydroalcoholic extract of capparispinosa on quality of sperm and rate of testosterone following induction of diabetes in rats. *J Isfahan Med Sch* 2014; 31(264): 2042-52. [In Persian].
  32. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 149-79.
  33. Shan L, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP. Effects of luteinizing hormone (LH) and androgen on steady state levels of messenger ribonucleic acid for LH receptors, androgen receptors, and steroidogenic enzymes in rat Leydig cell progenitors in vivo. *Endocrinology* 1995; 136(4): 1686-93.
  34. Yang J, Zhang Y, Wang Y, Cui S. Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol in Vitro* 2007; 21(4): 558-65.
  35. Bairy KL, Kumar G, Rao Y. Effect of acyclovir on the sperm parameters of albino mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 2009; 53(4): 327-33.
  36. Amirshahi T, Najafi G, Nejati V. Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin-induced male rats. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(3): 209-16.
  37. Farias JG, Bustos-Obregon E, Orellana R, Bucarey JL, Quiroz E, Reyes JG. Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia* 2005; 37(1): 47-52.
  38. Fanaei H, Khayat S, Halvaei I, Ramezani V, Azizi Y, Kasaeian A, et al. Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(2): 103-10.
  39. Roqueta-Rivera M, Stroud CK, Haschek WM, Akare SJ, Segre M, Brush RS, et al. Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *J Lipid Res* 2010; 51(2): 360-7.
  40. Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadirad A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27(12): 901-10.
  41. Kalantari A, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H. Evaluation of sperm quality in phenylhydrazine-induced hemolytic anemia impacts on mice and protective role of crocin. *Iranian Veterinary Journal* 2016; 77-84. [In Persian].
  42. Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. Achillea millefolium inflorescence aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2012; 10(4): 247-54.
  43. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48(6): 835-50.
  44. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005; 11(4): 337-49.
  45. Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnion F, Janny L, Grizard G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. *Gynecol Obstet Fertil* 2009; 37(6): 529-35. [In French].
  46. Shalzar JA, Najafi G, Hosseinchi M, Sedighnia A. Royal jelly alleviates sperm toxicity and improves in vitro fertilization outcome in Stanazolol-treated mice. *Iran J Reprod Med* 2015; 13(1): 15-22.
  47. Takayama H, Kato H. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol Reprod* 2002; 67(5): 1588-92.
  48. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev* 2000; 56(4): 520-6.
  49. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115(1): 1-7.
  50. Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 1998; 49(3): 619-27.
  51. Griesinger G, Franke K, Kinast C, Kutzelnigg A, Riedinger S, Kulin S, et al. Ascorbic acid supplement during luteal phase in IVF. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(4): 164-8.
  52. Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, Lee SH, et al. Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2006; 66(9): 2104-12.



## The Sperm and In-Vitro Fertilization (IVF) of Mice with Phenylhydrazine-Induced Hemolytic Anemia; Ameliorating the Effect of Royal Jelly and Vitamin C

Hojat Anbara DVM<sup>1</sup>, Rasoul Shahrooz PhD<sup>2</sup>, Mazdak Razi PhD<sup>3</sup>, Hasan Malekinejad PhD<sup>4</sup>, Gholamreza Najafi PhD<sup>3</sup>, Seyed Rashid Touni DVM<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Hemolytic anemia induced by phenylhydrazine (PHZ), as a hemolytic compound, can cause disorders in spermatogenesis and fertility. The present study aimed to evaluate the effect of vitamin C (Vit C) and royal jelly (RJ) as effective antioxidant compounds against phenylhydrazine-induced hemolytic anemia.

**Methods:** Adult male mice were randomly divided into four groups of eight. The first group received 0.1 ml of normal saline intraperitoneally (IP). The second group received 60 mg/kg of phenylhydrazine in 48-hour intervals intraperitoneally. The third group received 60 mg/kg of phenylhydrazine along with 250 mg/kg of vitamin C intraperitoneally and 100 mg/kg of royal jelly orally. The fourth group received the same doses of vitamin C and royal jelly as the third group. After 35 days, serum samples were taken, the sperms were collected from epididymis and in-vitro fertilization (IVF) was evaluated.

**Findings:** Phenylhydrazine-induced hemolytic anemia significantly decreased serum testosterone concentration and increased damaged DNA and immature nuclear sperm. Moreover, phenylhydrazine decreased the number of fertilized oocytes, two-cell and four-cell embryos, morula and blastocyst and increased arrested embryos. However, administering of royal jelly and vitamin C improved these parameters significantly.

**Conclusion:** It seems that royal jelly and vitamin C, as free radicals scavengers, have the potential to decrease oxidative damages on reproductive organ in phenylhydrazine-induced hemolytic anemia.

**Keywords:** Anemia, Phenylhydrazine, Royal jelly, Vitamin C, In-vitro fertilization

**Citation:** Anbara H, Shahrooz R, Razi M, Malekinejad H, Najafi Gh, Touni SR. **The Sperm and In-Vitro Fertilization (IVF) of Mice with Phenylhydrazine-Induced Hemolytic Anemia; Ameliorating the Effect of Royal Jelly and Vitamin C.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2193-2203

1- PhD Student, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran  
2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
3- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
4- Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
5- PhD Student, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
**Corresponding Author:** Rasoul Shahrooz PhD, Email: rasoulshahrooz1@gmail.com

## تشخیص اختلال شناختی خفیف با تخمین چگالی ماده‌ی خاکستری با استفاده از مورفومتری مبتنی بر Voxel در تصاویر MRI مغزی

زهرا کریمی<sup>۱</sup>، دکتر سعید کرمانی<sup>۲</sup>، دکتر مجید برکتین<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** اختلال شناختی خفیف (MCI یا Mild cognitive impairment) یک مرحله‌ی گذر بین سالمندی طبیعی و دمانس (Demence) در نظر گرفته می‌شود که در صورت پیشرفت، توانایی‌های ذهنی بیمار را به صورت غیر قابل برگشت پذیر مختل می‌نماید. در سال‌های اخیر، این اختلال، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است تا با تشخیص آن در مراحل اولیه، بتوان شروع دمانس را به تأخیر انداخت. راه‌های تشخیص این بیماری، آزمایش‌های بیوشیمی و آزمون‌های روان‌شناختی است. در سال‌های اخیر، تجزیه و تحلیل تصاویر Magnetic resonance imaging (MRI) به عنوان یک روش کم‌هزینه و غیر تهاجمی، مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. مطالعه‌ی حاضر، با هدف تخمین چگالی ماده‌های مغزی به روش مورفومتری مبتنی بر Voxel (Voxel-based morphometry یا VBM) از روی این تصاویر انجام شد تا گام مؤثری در تشخیص MCI فراهم گردد.

**روش‌ها:** در این مطالعه، از ۴۰ فرد شامل ۲۰ فرد سالم و ۲۰ بیمار مبتلا به اختلال شناختی خفیف به ترتیب با میانگین سنی  $4/6 \pm 4/4$  و  $3/9 \pm 6/3$  سال، تصاویر MRI گرفته شد. جهت تحلیل تصاویر و ارزیابی تغییرات چگالی و حجم ماده‌ی خاکستری، سفید و مایع مغزی نخاعی در بیماران و سالمندان شرکت کننده در این طرح، از مورفومتری مبتنی بر Voxel استفاده شد. به این منظور، به کمک ابزارهای SPM8 در نرم‌افزار Matlab<sub>2013b</sub> پردازش‌های لازم شامل طبیعی‌سازی مکانی، هماهنگ کردن مغزها به یک الگوی واحد و تقطیع مغز به سه ماده‌ی خاکستری، سفید و مایع مغزی نخاعی در نواحی مختلف صورت گرفت. به منظور یافتن نواحی که در ابتدای بیماری دچار آتروفی شده بودند، نتایج تغییرات شاخص‌های پیش‌گفته با استفاده از آزمون‌های آماری مبتنی بر Voxel، مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** به منظور تشخیص اختلال شناختی خفیف، کاهش چگالی ماده‌ی خاکستری در مقایسه با سایر ویژگی‌ها بسیار مؤثرتر بود ( $P < 0/050$ ) و در نواحی شکنج فرونتال فوقانی ( $P = 0/013$ )، شکنج تحتانی تمپورال ( $P = 0/013$ )، شکنج تحتانی فرونتال ( $P = 0/017$ )، پاراسترال ( $P = 0/022$ )، شکنج تمپورال فوقانی ( $P = 0/022$ )، اینسولا ( $P = 0/030$ ) و شکنج تمپورال میانی ( $P = 0/030$ ) مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** می‌توان از نواحی شناسایی شده در این مطالعه جهت تشخیص اختلال شناختی خفیف در بیماران مسن با استفاده از مورفومتری چگالی ماده‌ی خاکستری استفاده نمود تا در صورت مشاهده‌ی آتروفی در این نواحی، بیمار مورد بررسی‌های تشخیصی بیشتر و درمان قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** اختلالات شناختی خفیف، چگالی ماده‌ی خاکستری، تصاویر مغزی Magnetic resonance imaging، مورفومتری مبتنی بر Voxel، چگالی

**ارجاع:** کریمی زهرا، کرمانی سعید، برکتین مجید. تشخیص اختلال شناختی خفیف با تخمین چگالی ماده‌ی خاکستری با استفاده از مورفومتری مبتنی بر

Voxel در تصاویر MRI مغزی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۲۱۲-۲۲۰۴

### مقدمه

بیماری‌ها به ویژه در کشورهای پیشرفته تبدیل شده است (۱). افزایش امید به زندگی با بروز بیشتر بیماری‌های خاص دوره‌ی سالمندی و از همه مهم‌تر دمانس (Demence) و به ویژه دمانس آلزایمر همراه

با افزایش میانگین امید به زندگی در جهان، بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease) به یکی از مهم‌ترین و پرهزینه‌ترین

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

۲- استادیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و گروه بیوالکترونیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه روان‌پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: kermani@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر سعید کرمانی

افزایش سن در نظر گرفته می‌شوند و بیماری تلقی نمی‌گردند. از جمله راه‌های تشخیص این بیماری، آزمایش‌های بیوشیمی، آزمون‌های روان‌شناختی Mini mental state examination (MMSE) و Neuropsychiatry unit cognitive assessment tool (NUCOG) و بررسی ژنتیک و روش‌های تصویربرداری است.

در سال‌های اخیر، با افزایش وضوح تصاویر آناتومیک در تصاویر ثبت شده از ساختار مغز انسان، این تصاویر برای بررسی غیر تهاجمی ساختار مغز انسان استفاده می‌شود (۴). از اهداف تصویربرداری عصبی مدرن، کمک به تشخیص زودهنگام و دقیق آلزایمر است؛ چرا که، در این مراحل است که درمان دارویی می‌تواند مؤثر واقع شود. همچنین، توانایی‌های بالقوه‌ی تصاویر Magnetic resonance imaging (MRI) نسبت به سایر روش‌های تصویربرداری موجود مانند Positron emission tomography (PET) و Computed tomography (CT) به عنوان یک روش کم هزینه تر و بدون استفاده از پرتوهای یونیزان و مضر و با قدرت تفکیک فضایی بالا و به عنوان یک روش غیر تهاجمی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است و به متخصص کمک می‌کند تا تغییرات آناتومیک کوچک را که به راحتی قابل تشخیص نیستند، مشاهده کند.

پژوهش‌های اخیر، تصاویر مغزی افراد مبتلا به اختلالات شناختی و آلزایمر را با افراد سالم مقایسه کرده‌اند. مواردی که به کمک تحلیل تصاویر پزشکی در تشخیص این بیماری مورد بررسی قرار گرفته است، شامل مقایسه‌ی تصاویر افراد سالم و افراد مبتلا و بررسی آتروفی مغزی و کاهش چشمگیر حجم مغزی، بررسی چگالی ماده‌ی خاکستری (Gray matter یا GM)، ماده‌ی سفید (White matter یا WM) و مایع مغزی-نخاعی (Cerebrospinal fluid یا CSF) و نیز اندازه‌گیری ضخامت قشر مغز می‌باشد که در اثر ابتلا به MCI دستخوش تغییر می‌شود (۵)، اما تاکنون به یک روش مطمئن که تفاوت قطعی بین آن‌ها را تشخیص دهد و بیمار آلزایمر را پیش‌بینی کند، دست نیافته‌اند (۶). با این وجود، این روش در مقایسه با مطالعات عصب‌شناسی که به بررسی رفتاری و شناختی انسان‌ها می‌پردازد، بسیار کارآمدتر است؛ چرا که در مطالعات عصب‌شناسی، تفاوت بین افراد با میانگین‌گیری حذف می‌شود و این کار، سبب نادیده گرفتن اطلاعات اساسی ناشی از تفاوت افراد می‌شود (۷).

از طرفی، با توجه به این که در آتروفی ماده‌ی خاکستری، سایر ماده‌های مغزی نیز دستخوش تغییر می‌شود، در این پژوهش از چگالی ماده‌ی خاکستری، که در واقع نسبت ماده‌ی خاکستری به مجموع ماده‌ی خاکستری و ماده‌ی سفید و مایع مغزی-نخاعی می‌باشد، به عنوان پیش‌بینی‌کننده در بیماری MCI استفاده گردید. البته موضوع آتروفی مغزی با چالش زیادی روبه‌رو است؛ چرا که، هم در افراد کهن‌سال و هم در افراد سالم ممکن است آتروفی مغزی مشاهده شود

است. پیری، یکی از عوامل خطر اصلی برای بیماری آلزایمر است و تخمین زده می‌شود که شیوع آلزایمر بعد از ۶۰ سالگی هر ۵ سال دو برابر می‌شود (۲).

یک نفر از هر ۱۰ نفر بالاتر از ۶۵ سال و یک نفر از هر دو نفر انسان بالاتر از ۸۵ سال مبتلا به بیماری آلزایمر می‌باشند. بنا بر این، بیماری آلزایمر با پیر شدن همراه است و با توجه به این که زنان طول عمر بالاتری از مردان دارند، زنان بیشتری به این بیماری مبتلا می‌گردند (۲). متأسفانه، این بیماری و سایر انواع دمانس، هزینه‌ی سنگینی را بر اقتصاد جوامع تحمیل می‌کنند و مراقبت از این بیماران طولانی و برای خانواده‌ها و سیستم‌های بهداشتی طاقت‌فرسا می‌باشد. آخرین آمارهای موجود، رشد جمعیت ایران را ۱/۲ درصد تخمین زده است؛ در حالی که رشد جمعیت سالمندی را ۱/۹ درصد گزارش می‌کنند. در سال ۱۳۷۵، ۶/۶ درصد جمعیت ایران را سالمندان تشکیل داده بودند. این رقم در سال ۱۳۷۹، ۷/۸ درصد بود و پیش‌بینی می‌شود که در سال ۱۴۰۰ این رقم بالغ بر ۱۰ درصد گردد و این بدان معنی است که در این سال، جامعه‌ی ایران جمعیتی سالخورده تلقی می‌گردد (۳). از طرف دیگر، برنامه‌های کنترل بیماری‌های عفونی، مرگ و میر کودکان و ارتقای بهداشت موجب افزایش امید به زندگی در جامعه‌ی ایران گردیده است.

اغلب پژوهش‌های عصب-روان‌شناختی زوال عقل، بر روی بیماری آلزایمر تمرکز کرده‌اند. اختلال شناختی خفیف (Mild cognitive impairment یا MCI) یک مرحله‌ی گذر بین سالمندی طبیعی و دمانس در نظر گرفته می‌شود. در سال‌های اخیر، این اختلال مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است تا با تشخیص آن در مراحل اولیه، بتوان شروع دمانس را به تأخیر انداخت؛ چرا که، این بیماری شایع‌ترین علت زوال عقل است و ۶۰-۵۰ درصد کل سالمندان دچار زوال عقل، به این بیماری (آلزایمر) مبتلا هستند. در این راستا، جستجو برای نشانگرهای پیش‌آیند بیماری آلزایمر جهت پیش‌آگهی بهتر و کاربرد سریع و مناسب درمان‌های اختصاصی بیمار که در حال حاضر موجود یا در حال ایجاد هستند، ضروری می‌باشد (۳).

بنا بر این، بیماری آلزایمر یک پدیده‌ی پیش‌رونده به علت از بین رفتن سلول‌های مغز است که علائم عصبی و روانی بیماری و کاهش توانایی‌های ذهنی بیمار غیر قابل برگشت می‌باشد. درمان قطعی این بیماری تا کنون شناخته نشده است و داروها و درمان‌های کنونی تنها کندکننده‌ی پیشرفت بیماری هستند. به همین دلیل، تشخیص زودهنگام این بیماری به ویژه در مرحله‌ی نخست دارای اهمیت بسیار زیادی است و نقش به‌سزایی در بهبود کیفیت زندگی و کاهش هزینه‌های مبتلایان خواهد داشت. از طرفی، تشخیص پزشکی بیماری آلزایمر سخت است و نشانه‌های آن به طور معمول به عنوان پیامدهای



تخمین چگالی ماده‌ی خاکستری مغز از روی تصاویر MRI و با روش VBM، جهت تشخیص زودهنگام اختلالات روان شناختی و استفاده از تکنیک‌های نوین پردازش تصویر جهت پیش بینی نواحی که در شروع بیماری دچار آتروفی می‌شوند، انجام شد.

### روش‌ها

جمع‌آوری داده: برای گردآوری جمعیت نمونه، از مراجعه کنندگان به واحد آنژیوگرافی بیمارستان نور و حضرت علی اصغر (ع) اصفهان استفاده شد. یک مصاحبه‌ی نیمه ساختار یافته توسط دستیار روان پزشکی انجام گردید. معیارهای ورود برای جمعیت مورد مطالعه شامل سن بیشتر از ۶۰ سال و حداقل تحصیلات ابتدایی بود و معیارهای خروج شامل سابقه‌ی مشکلات روان پزشکی و جسمی جدی، ضربه به سر، مصرف داروهای روان پزشکی و یا مصرف مواد و یا بر اساس آزمون‌های شناختی، ابتلا به دمانس بود. قابل ذکر است که ابتلا به پرفشاری خون، دیابت و بیماری قلبی بررسی شد، اما از معیارهای خروج از مطالعه نبود. داوطلبان از نظر معیارهای ورود و خروج بررسی شدند و در صورت دارا بودن شرایط ورود به مطالعه، برای این افراد آزمون‌های Mini mental state examination (MMSE) و Neuropsychiatry unit cognitive assessment tool (NUCOG) انجام گرفت. افرادی که در آزمون MMSE نمرات ۲۶-۲۱ و در آزمون NUCOG نمرات ۸۷-۷۵ را کسب نمودند، به عنوان افراد مبتلا به MCI در گروه مورد قرار گرفتند و افرادی که نمره‌ی MMSE بالای ۲۶ و نمره‌ی NUCOG بالای ۷۸ را کسب کردند، به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. آزمون‌های MMSE و NUCOG از قبل به فارسی ترجمه و روایی و پایایی آن‌ها تأیید شده بود (۲).

ثبت تصاویر: تصاویر MRI مغزی تمامی افراد تحت مطالعه، در مرکز تصویربرداری شفا در استان اصفهان با استفاده از دستگاه MRI ۱/۵ تسلا از کمپانی MAGNETOM Avanto ثبت شده بود. تصاویر به صورت سه بعدی از نوع Flair و T1 بود که به منظور ایجاد تصاویر آناتومی با وضوح بالا، تنظیمات در دستگاه به ترتیب زمان TR برابر ۳۰۰ میلی ثانیه، زمان T1 ۷ میلی ثانیه، ۵ T2 میلی ثانیه و میزان Flip angle برابر با ۸ درجه بود. تصویر نهایی با قالب دایکوم ذخیره گردید. نمونه‌ای از تصاویر ثبت شده با تنظیمات ذکر شده در شکل ۱ آمده است.

تحلیل تصاویر MRI با روش VBM: برای استفاده از روش ریخت‌شناسی مغز، دانستن دو مسأله لازم است. اول این که ویژگی مورد علاقه که قرار است بررسی شود باید قابل اندازه‌گیری باشد و دوم این که برای مقایسه‌ی این اندازه‌گیری‌ها به صورت کمی، باید از روش‌های آماری استفاده کرد.

و به راحتی قابل تفکیک نباشد و در بین بیماران مبتلا به آلزایمر نیز بسیار متغیر است. به عبارتی، نواحی از مغز که زودتر از سایر نواحی دچار آتروفی می‌شوند و به عنوان یک نشانه برای این بیماری محسوب می‌شود نیز بسیار متفاوت است. بنا بر این، به منظور تشخیص و افتراق مبتلایان به MCI از افراد سالمند طبیعی به دنبال یافتن بهترین ویژگی‌ها در نواحی مغزی هستیم که در آن بهترین شاخص برای تشخیص زودهنگام آلزایمر یا به عبارتی MCI به دست آید؛ چرا که در تشخیص زودهنگام، یافتن نواحی که در ابتدا دچار آتروفی می‌شوند، بسیار مهم است.

مطالعات زیادی انجام شده است و در آن‌ها الگوهای متفاوتی از آتروفی مغز را در سطوح مختلف بیماران مبتلا به MCI نشان داده است. اکثر یافته‌ها، کاهش حجم ماده‌ی خاکستری را در مراحل اولیه‌ی MCI در نواحی فوقانی لوب مدیال تمپورال گزارش داده‌اند و در اثر پیشرفت این بیماری، قسمت‌های فوقانی و قشری لوب تمپورال و فرونتال و Cingulum نیز درگیر می‌شوند (۱۱-۷). به همین دلیل، در حال حاضر، هیچ یک از نواحی را نمی‌توان به صورت ۱۰۰ درصد برای تشخیص زودهنگام آلزایمر به کار گرفت و تشخیص با استفاده از تصاویر پزشکی دچار مشکل است. به دلیل محدودیت‌های تشخیصی MCI، برای مطالعه‌ی ناحیه‌ی مغز (Region of interest یا ROI) بهترین روش، ریخت‌شناسی مغز یا همان مورفومتری مبتنی بر Voxel (Voxel-based morphometry یا VBM) می‌باشد.

روش VBM، اندازه‌گیری تغییرات ساختاری مغز با افزایش سن، یادگیری، بیماری و یا تکامل مغز است و به منظور اندازه‌گیری کمی تغییرات موارد ذکر شده در اثر بیماری، ریخت‌شناسی بهترین روش می‌باشد. ریخت‌شناسی مغز با داده‌های تصویربرداری غیر تهاجمی سیستم عصبی، به ویژه تصاویر MRI آغاز شد. این داده‌ها از ابتدا دیجیتال بود و این امر، امکان تجزیه و تحلیل این تصاویر را با روش‌های پیشرفته‌ی ریاضی و آماری فراهم کرد. همچنین، به کمک این روش این امکان فراهم شد که ویژگی‌های آناتومیک مغز مانند شکل، جرم، حجم و ویژگی‌های دیگر مانند چگالی ماده‌ی خاکستری مغز (Gray matter density)، اتصالات ماده‌ی سفید مغز، ضخامت قشر مغز و مایع مغزی-نخاعی به صورت کمی اندازه‌گیری شود. سپس، می‌توان این ویژگی‌ها را به حجم مغز یا سطح مغز نگاشت کرد و به الگوها و گسترش این ویژگی‌ها در طول زمان و بین افراد مختلف و یا گونه‌های مختلف دست یافت (۱۲).

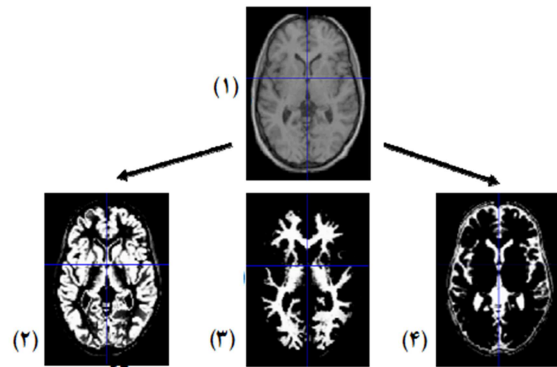
بنا بر این، نکته‌ی حایز اهمیت برای پژوهشگران، یافتن نواحی از مغز است که در شروع بیماری دچار آتروفی می‌شود. مسلم است که روش‌های پردازش تصویر به عنوان مشاور در تشخیص بیماری برای روان پزشک بسیار ارزشمند خواهد بود. مطالعه‌ی حاضر، با هدف

- پیش پردازش تصویری.

پیش پردازش فضایی: برای اعمال روش های ریخت شناسی تصاویر MRI مغزی مبتنی بر T1، انجام یک سری پیش پردازش لازم است. VBM شامل فرایندی است که ابتدا تصاویر را در یک فضای استاندارد مانند Montreal Neurological Institute (MNI) هماهنگ می کند تا بتوان تصاویر را به یک الگوی واحد تطبیق داد. از مزایای این استانداردسازی، قابلیت مقایسه با مقاله های معتبر علمی است که در واقع، یک مرجع شناخته می شوند و نیز توانایی بررسی تغییرات در سطح Voxel را دارد و برای بررسی نقطه به نقطه یا Voxel به Voxel و به صورت ناحیه ی مورد نظر، VBM ابزاری مفید می باشد. در ادامه، تصویر MRI به بافت مغزی و غیر مغزی تقسیم و سپس به سه بخش ماده ی خاکستری (GM)، ماده ی سفید (WM) و مایع مغزی- نخاعی (CSF) تقسیم گردید (۱۲).

تقطیع: در این مرحله، تصاویر به سه بافت ماده ی خاکستری، ماده ی سفید و مایع مغزی- نخاعی تقطیع شد. این کار با ترکیب یک نگاهت احتمال پیشین که با توجه به دانش قبلی از توزیع بافت های یک فرد سالم به دست آمده بود و آنالیز دسته بندی مدل ترکیبی حاصل شد و چگالی در Voxels های بافت های مختلف توزیع گردید. در تقطیع فرض شد که تصویر مغز دارای سه بافت مجزا می باشد که هر کدام از این بافت ها دارای یک توزیع طبیعی چند متغیره است که توسط یک بردار میانگین، ماتریس کواریانس و تعدادی Voxel متعلق به آن توزیع مشخص می شود. سپس برای هر گروه، تعداد Voxels ها، میانگین شدت Voxels ها و واریانس محاسبه شد. آن گاه، با داشتن پارامترهای توزیع طبیعی، تابع توزیع احتمال تعلق به هر گروه مشخص گردید و سپس با استفاده از تئوری Bayesian و داشتن تصویر احتمال اولیه و شباهت (تابع توزیع تعلق به هر گروه) مقدار احتمال پسین به دست آمد. مراحل پیش گفته، تا هم گرایی (کم شدن شباهت از حدی خاص) و یا رسیدن به تعداد دفعات خاص تکرار شد (۱۳).

پس از این مرحله، از روی تصاویر، الگو ایجاد شد. به این منظور، میانگین بافت خاکستری مغز تمام افراد، به عنوان الگوی اولیه در نظر گرفته شد. سپس، تغییر شکل هر کدام از تصاویر نسبت به الگو محاسبه گردید و وارون این تغییر شکل ها به الگو اعمال شد و الگوی جدید به دست آمد. آن گاه، این الگوریتم در چند مرحله تکرار شد. پس از ایجاد الگو از روی تصاویر، طبیعی سازی انتقال تصاویر به فضای الگو انجام شد. در این مرحله، همچنین غیر یکنواختی شدت تصویر نیز اصلاح شد. با توجه به این که احتمال تعلق برای هر Voxel عددی بین صفر و یک است و همچنین در این مرحله تصویر تقطیع شده باینری می شود، بنا بر این هر Voxel به احتمال ترین بافت ماده ی سفید،



شکل ۱. نمونه ای از تقطیع تصویر Magnetic resonance imaging (MRI) مغز به سه بافت، (۲) ماده ی خاکستری (Gray matter) یا (GM)، (۳) ماده ی سفید (White matter یا WM) و (۴) مایع مغزی- نخاعی (Cerebrospinal fluid یا CSF)

مورفومتری مبتنی بر Voxel، یکی از پرکاربردترین روش ها در بررسی تفاوت بین افراد است. به زبان ساده، VBM مقایسه ای است که برای بررسی محلی تمرکز ماده ی خاکستری مغز بین افراد مختلف انجام می شود.

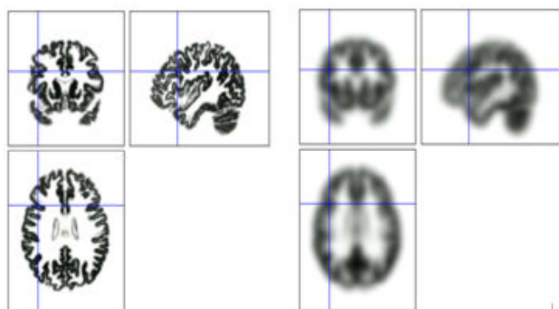
طراحی یک مطالعه ی ریخت شناسی، با در نظر گرفتن عوامل مختلف تأثیرگذار بر آن می تواند به چند حالت تقسیم شود:

بسته به هدف مورد نظر (مانند رشدشناسی، آسیب شناسی و یا تکامل نژادی) می توان مطالعه را به دو روش طولی (در یک مغز خاص و در زمان های مختلف) و مقطعی (بین مغزهای مختلف) تقسیم کرد. تصاویر مغز را می توان با ویژگی های مختلفی از تصویربرداری سیستم عصبی جمع آوری کرد. ویژگی های مغز را می توان با حالت های مختلف تحلیل کرد (مثل بررسی کل مغز، ناحیه ی مورد نظر و یا ساختارهای قشری و یا زیرقشری خاص). این داده را می توان از ترکیب روش های مختلف و مراحل تحلیل مختلف پردازش کرد.

بسته ی نرم افزاری Statistical probability mapping (SPM):

روش VBM با استفاده از بسته های نرم افزاری مانند نگاهت احتمالات مبتنی بر آمار (SPM) و کتابخانه ی نرم افزاری FMRIB (Functional MRI of the brain) قابل پیاده سازی است. SPM تحت ویندوز و در برنامه ی Matlab قابل اجرا می باشد؛ از این رو، در این مطالعه، جهت پردازش VBM از بسته ی SPM8 استفاده شد که از سایت دانشگاه University College London (UCL) (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/ext>) قابل دانلود می باشد. به کمک واسط گرافیکی SPM، می توان به موارد زیر دسترسی پیدا کرد:

- مشخص کردن مدل و تخمین مشخصات آن
- استنباط های آماری



شکل ۳. تصویر بافت خاکستری مغز به همراه شکل هموار شده‌ی آن در سه صفحه‌ی متعام

مدولاسیون: مرحله‌ی دیگری که می‌تواند در پیش پردازش انجام شود، جبران اثر طبیعی‌سازی است که به این منظور، «تفاوت حجم» مطرح می‌شود. به عنوان مثال، شخصی که لوب گیجگاهی او نصف حجم الگو باشد، بایستی جهت طبیعی‌سازی و هماهنگ کردن شخص با الگو، حجم لوب گیجگاهی دو برابر شود که این امر، باعث از دست رفتن اطلاعات حجم اصلی این ناحیه می‌شود.

در این حال، VBM می‌تواند برای مقایسه، از چگالی نسبی ماده‌ی سفید و ماده‌ی خاکستری خروجی مرحله‌ی طبیعی‌سازی استفاده کند. به این مرحله که جبران‌سازی در آن انجام می‌شود، طبیعی‌سازی گفته می‌شود. این مرحله، شامل ضرب کردن چگالی ماده‌ی خاکستری در حجم نسبی آن قبل از مرحله‌ی طبیعی‌سازی فضایی است. به عبارتی، برای Voxel‌های دو مغز با اندازه‌های متفاوت پس از طبیعی‌سازی به یک الگو، شدت تصویر برای ثابت ماندن شدت ماده‌ی خاکستری قبل و بعد از طبیعی‌سازی، تغییر می‌کند.

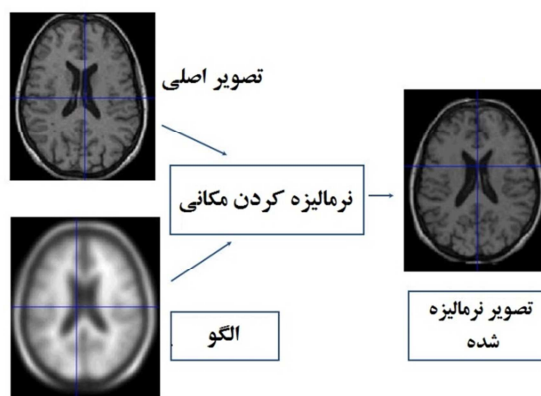
تحلیل آماری نتایج خروجی VBM: پس از انجام دادن مراحل پیش پردازش، تصویر سطح خاکستری هماهنگ شده‌ی کلی مغز افراد مختلف در دسترس بود. در این مرحله، برای در نظر گرفتن تفاوت سطح خاکستری Voxel‌های مغز بین افراد سالمند طبیعی و افراد مبتلا به MCI، یک مدل آماری  $t$  برای دو گروه ناهمسان در نظر گرفته شد. این مدل آماری، دارای چند متغیر مستقل بود که باید همبستگی آن‌ها با متغیر وابسته که سطح خاکستری Voxel‌های مغز است، بررسی می‌شد. مدلی که در این تحقیق در نظر گرفته شد، شامل متغیرهای مستقل سن، جنسیت و میزان تحصیلات بود که در شکل ۴ قابل مشاهده می‌باشد.

هدف از پی بردن به این موضوع، این است که حجم و چگالی ماده‌ی خاکستری مغز افراد مبتلا به MCI، چه تفاوتی با ساختار مغز افراد سالمند طبیعی دارد؟ در تشخیص MCI، کدام یک از ویژگی‌های حجم و چگالی ماده‌ی خاکستری کارآمدتر است؟ از طرفی، در پیش بینی بیماری MCI، یافتن نواحی که در ابتدای بیماری دچار

ماده‌ی خاکستری و مایع مغزی-نخاعی دیده می‌شود. در شکل ۱، نمونه‌ای از تقطیع مغز به سه بافت ماده‌ی خاکستری، ماده‌ی سفید مغز و مایع مغزی-نخاعی دیده می‌شود.

طبیعی‌سازی فضایی: در این مرحله، هر کدام از تصاویر MRI با یک الگو هماهنگ شد که این الگو، با میانگین‌گیری از تعداد زیادی تصاویر MRI به دست آمد. طبیعی‌سازی شامل دو مرحله بود که یکی از آن‌ها یک تبدیل تعلق ۱۲ پارامتری و دیگری یک تبدیل غیر خطی با ترکیب تعدادی تابع پایه بود. بدین ترتیب که در قسمت اول آن، یک تابع تعلق ۱۲ پارامتر، تصویر را با الگو هماهنگ می‌نمود که بدین منظور، از روش Bayesian و محاسبه‌ی بیشینه‌ی احتمال پسین با داشتن احتمال پسین از اندازه‌ی مغز طبیعی استفاده گردید و در قسمت دوم برای یک تغییر شکل غیر خطی، از مدل شدن با ترکیب خطی از توابع پایه‌ی فضایی استفاده شد که بدین منظور، از کمینه کردن مربعات خطای اختلاف بین تصویر و الگو برای تخمین ضرایب این توابع پایه استفاده گردید.

باید توجه داشت که چون هدف نهایی پژوهشگران بررسی تفاوت‌ها بود، طبیعی‌سازی فضایی به این هدف انجام نشد که تمام ویژگی‌های مغزی به طور کامل هماهنگ شود؛ بلکه فقط برای هماهنگی شکل کلی مغز با الگو انجام شد. در شکل ۲، نمونه‌ای از تصویر مغز به همراه الگو و نتیجه‌ی طبیعی‌شدن تصویر توسط الگو دیده می‌شود.



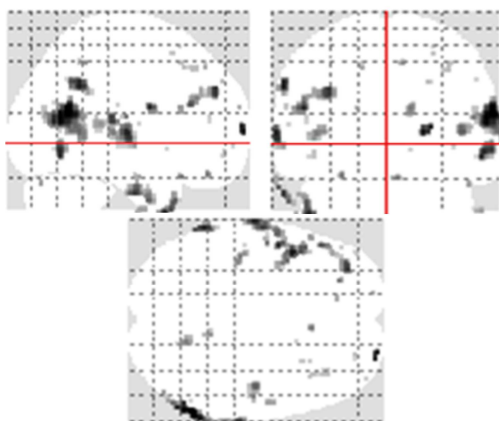
شکل ۲. نمونه‌ای از تصویر مغز به همراه الگو و تصویر نرمالیزه شده توسط الگو

هموارسازی: در مرحله بعد تصویر با همگشت شدن با یک هسته گوسی متناسب، هموارسازی می‌شود. به دو دلیل، این مرحله بایستی انجام شود. یکی این که هموارسازی، سبب می‌شود که عدد هر Voxel، میانگینی از ماده‌ی خاکستری و ماده‌ی سفید Voxel‌های همسایه‌اش باشد و دیگر این که باعث جبران کردن طبیعت غیر دقیق طبیعی‌سازی فضایی می‌شود. در شکل ۳، تصویر بافت خاکستری مغز به همراه شکل هموار شده‌ی آن دیده می‌شود.

برچسب‌گذاری شده استفاده می‌کند که ۹۰ ناحیه‌ی آناتومی در مغز را مشخص می‌کند و با کمک آن مختصات نقاط ورودی  $X$ ،  $Y$  و  $Z$  در فضای سه بعدی MNI، تعیین می‌شود که متعلق به کدام ناحیه‌ی آناتومی در مغز است.

#### یافته‌ها

در شکل ۵، خروجی نرم افزار SPM پس از تحلیل آماری حجم ماده‌ی خاکستری برای دو گروه مستقل افراد سالم و افراد مبتلا به MCI دیده می‌شود. پارامترهای سن، جنس، میزان تحصیلات، سابقه‌ی دیابت و پرفشاری خون با استفاده از ANCOVA در نظر گرفته شد. ملاحظه می‌شود که ویژگی حجم ماده‌ی خاکستری جهت تشخیص و تمایز دو گروه مؤثر نبود و بدون اصلاح، و با سطح معنی‌داری  $P < 0/001$  هیچ ناحیه‌ی ای یافت نشد. این در حالی است که در بررسی چگالی، پس از تحلیل آماری SPM، نواحی با مختصات  $X$ ،  $Y$  و  $Z$  و با اصلاح Family wise error (FEW) و با سطح اطمینان ۰/۰۵، ۹ ناحیه جهت تشخیص و تمایز دو گروه به دست آمد و نتایج آن در خروجی SPM در شکل ۴ دیده می‌شود.



شکل ۴. در این شکل خروجی برنامه‌ی

#### Statistical probability mapping8 (SPM8) و تفاوت‌های

ساختاری در ماده‌ی خاکستری افراد سالم و افراد مبتلا به Mild cognitive impairment (MCI) مورد ارزیابی قرار گرفته و دیده می‌شود. با تجزیه و تحلیل آماری آزمون  $t$ ، تأثیر پارامترهای سن و جنس و میزان تحصیلات و سابقه‌ی دیابت و پرفشاری خون با استفاده از ANCOVA حذف شد و نواحی با تغییرات عمده‌ی ناشی از کاهش چگالی ماده‌ی خاکستری در بیماران مبتلا به MCI در شکل در سه صفحه‌ی متعامد استاندارد همراه با مختصات  $X$ ،  $Y$  و  $Z$  ارائه شده است ( $P = 0/050$ ) و نواحی که در شروع بیماری دچار آتروفی و کاهش چگالی ماده‌ی خاکستری می‌شوند، تعیین شده است.

تطبیق مختصات به دست آمده در فضای سه بعدی MNI با نواحی اطلس‌ها: از آن جایی که تصاویر به فضای MNI منتقل می‌شود، از اطلس WFU-pickatlas در اطلس آناتومی استفاده گردید. به این منظور، از Anatomy toolbox (<http://fil.ion.ucl.ac.uk/spm/ext>) که به SPM اضافه می‌شود، استفاده شد. این ابزار، از یک الگوی

شکل ۵. در این شکل خروجی برنامه‌ی

#### Statistical probability mapping8 (SPM8) و تفاوت‌های

ساختاری در ماده‌ی خاکستری افراد سالم و افراد مبتلا به Mild cognitive impairment (MCI) مورد ارزیابی قرار گرفته و دیده می‌شود. با یک تحلیل آزمون  $t$  تأثیر پارامترهای سن، جنس، میزان تحصیلات، سابقه‌ی دیابت و پرفشاری خون با استفاده از ANCOVA حذف شد و نواحی با تغییرات عمده‌ی ناشی از کاهش چگالی ماده‌ی خاکستری در بیماران مبتلا به MCI در شکل در سه صفحه‌ی متعامد استاندارد همراه با مختصات  $X$ ،  $Y$  و  $Z$  مشاهده می‌شود ( $P = 0/001$ ).

بنا بر این، به منظور تشخیص MCI، تمایز در کاهش چگالی ماده‌ی خاکستری بسیار مؤثرتر در مقایسه با سایر ویژگی‌ها حجم بود

راست لوب آهیانه، قسمت چپ لوب فرونتال، جسم پینه‌ای (کورپوس کالوزوم)، قسمت راست لوب فرونتال، شکنج سینگولیت راستی و آمیگدالای چپ است (۱۷-۸). یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که در نواحی شکنج فرونتال فوقانی، شکنج تحتانی تمپورال، شکنج تحتانی فرونتال، پاراسترال، شکنج تمپورال فوقانی، اینسولا و شکنج تمپورال میانی، آتروفی زود هنگام مشاهده شده است که این نتایج با یافته‌های مقالات اخیر تطابق داشته است.

مطالعات زیادی با استفاده از روش VBM انجام شده و در آن‌ها، الگوهای متفاوتی از آتروفی مغز را در سطوح مختلف بیماران مبتلا به MCI نشان داده شده است. اکثر یافته‌ها، کاهش حجم ماده‌ی خاکستری را در مراحل اولیه‌ی MCI در نواحی فوقانی لوب مدیال تمپورال گزارش داده و در اثر پیشرفت این بیماری، قسمت‌های فوقانی و قشری لوب تمپورال و فرونتال و سینگولوم نیز درگیر شده است (۱۰-۷، ۳). بنا بر این، می‌توان این نواحی را به عنوان اولین نواحی که در اثر بیماری دچار آتروفی می‌شوند، در نظر گرفت. بنا بر این، بهترین ویژگی در تصاویر MRI جهت تشخیص MCI کاهش چگالی ماده‌ی خاکستری است که به کمک مورفومتری مبتنی بر Voxel و مقایسه‌ی تصاویر در سطح Voxel به دست آمده است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد زهرای کریمی به شماره‌ی طرح ۳۹۳۳۴۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد که در گروه بیوالکترونیک و مهندسی پزشکی دانشکده‌ی فناوری‌های نوین علوم پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسیده است. بدین وسیله از زحمات استادان محترم گروه مهندسی پزشکی (بیوالکترونیک) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و خانم مهندس آرزو کریمی زاده که ما را در انجام این طرح تحقیقاتی یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را اعلام می‌دارد.

( $P < 0/050$ ) و در نواحی شکنج فرونتال فوقانی ( $P = 0/013$ )، شکنج تحتانی تمپورال ( $P = 0/013$ )، شکنج تحتانی فرونتال ( $P = 0/017$ )، پاراسترال ( $P = 0/022$ )، شکنج تمپورال فوقانی ( $P = 0/022$ )، اینسولا ( $P = 0/030$ ) و شکنج تمپورال میانی ( $P = 0/030$ ) آتروفی زود هنگام مشاهده شد. نتایج نواحی مرتبط با مختصات X، Y و Z و تطبیق آن با اطلس‌های (Automated anatomical labeling) AAL و Talairach Daemon (TD) Label و لوب‌های مغزی در جدول ۱ آمده است.

### بحث

در این مقاله، با استفاده از روش‌های نوین پردازش تصویر و مورفومتری Voxel به Voxel، روشی جهت تشخیص بیماری MCI ارائه شد. در این روش، با استفاده از پیش پردازش، ماده‌ی خاکستری مغز تقطیع شد و پس از طبیعی‌سازی به فضای استاندارد MNI و با انجام آزمون t، تصاویر دو گروه با هم مقایسه گردید.

در ابتدا، حجم ماده‌ی خاکستری مغز افراد به منظور دستیابی به بهترین ناحیه از مغز که در شروع بیماری دچار آتروفی می‌شود، بررسی گردید که با سطح اطمینان ۰/۰۰۱ و بدون اصلاح هیچ ناحیه‌ای تشخیص داده نشد؛ این در حالی است که در بررسی چگالی ماده‌ی خاکستری که در واقع نسبت ماده‌ی خاکستری به مجموع ماده‌ی خاکستری، ماده‌ی سفید و مایع مغزی-نخاعی می‌باشد، با سطح اطمینان ۰/۰۵ و با اصلاح FWE، نواحی از مغز که در اثر بیماری MCI دچار کاهش ماده‌ی خاکستری می‌شوند، به دست آمد. در واقع، در اثر بیماری آلزایمر، نه تنها ماده‌ی خاکستری کاهش یافت، بلکه کاهش ماده‌ی سفید و نیز افزایش مایع مغزی-نخاعی واقع شد.

نواحی که در مقالات در افتراق دو گروه سالم و مبتلا به MCI مؤثرتر از نواحی دیگر باشد، شامل لوب تمپورال میانی راست، لوب تمپورال میانی چپ، شکنج سینگولیت چپی، هیپوکامپوس چپ، قسمت

جدول ۱. نتایج حاصل از تحلیل آماری در چگالی ماده‌ی خاکستری

ناحیه	زیر ناحیه بر حسب TD	اندازه‌ی خوشه به ازای $P < 0/050$	Z	Y	X
لوب جلویی	شیار جلویی فوقانی	۰/۰۱۳	۴۸	۲۶	۲۴
لوب گیجگاهی	شیار گیجگاهی تحتانی	۰/۰۱۳	-۳۶	-۱۶	۴۶
لوب جلویی	شیار تحتانی جلویی	۰/۰۱۷	۳۲	۱۰	۵۰
لوب جلویی	لوبول پرینتال تحتانی	۰/۰۲۲	۵۰	-۴۲	۱۰
لوب گیجگاهی	شیار گیجگاهی فوقانی	۰/۰۲۲	۲۰	-۵۶	۶۰
لوب فوقانی	شیار فوقانی میانی	۰/۰۳۰	۵۰	۲۲	۳۶
لوب گیجگاهی	شیار گیجگاهی میانی	۰/۰۳۰	-۳۰	-۱۰	-۶۲
زیر لویی	جزیره‌ی مغزی	۰/۰۳۰	۶	۱۰	-۳۶
زیر لویی	جزیره‌ی مغزی	۰/۰۳۰	۰	-۱۶	-۴۴



## References

1. Penner C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hanninen T, Laakso MP, et al. Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiol Aging* 2004; 25(3): 303-10.
2. Barekatin M, Tavakoli M. Neuropsychological assessments in early diagnosis of dementia. *J ResBehav Sci* 2012; 10(3): 228-38. [In Persian].
3. Mirzaei M, Shams Ghahfarokhi M. Demography of elderly in Iran according to the census 1956-2006. *Salmand Iran J Ageing* 2007; 2(5): 326-31. [In Persian].
4. Manly JJ, Bell-McGinty S, Tang MX, Schupf N, Stern Y, Mayeux R. Implementing diagnostic criteria and estimating frequency of mild cognitive impairment in an urban community. *Arch Neurol* 2005; 62(11): 1739-46.
5. Kermani S, Karimi Z, Barekatin M. Evaluation and estimation of gray matter volume using voxel-based morphometry of the brain magnetic resonance imaging (MRI) in normal elderly people and those with mild cognitive impairment. *J Isfahan Med Sch* 2015; 33(353): 1649-61.
6. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 2004; 256(3): 183-94.
7. Bickel H, Mosch E, Seigerschmidt E, Siemen M, Forstl H. Prevalence and persistence of mild cognitive impairment among elderly patients in general hospitals. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; 21(4): 242-50.
8. Whitwell JL, Przybelski SA, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, et al. 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* 2007; 130(Pt 7): 1777-86.
9. Barekatin M, Askarpour H, Zahedian F, Walterfang M, Velakoulis D, Maracy MR, et al. The relationship between regional brain volumes and the extent of coronary artery disease in mild cognitive impairment. *J Res Med Sci* 2014; 19(8): 739-45.
10. Mosconi L, De SS, Li J, Tsui WH, Li Y, Boppana M, et al. Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiol Aging* 2008; 29(5): 676-92.
11. Whitwell JL, Petersen RC, Negash S, Weigand SD, Kantarci K, Ivnik RJ, et al. Patterns of atrophy differ among specific subtypes of mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2007; 64(8): 1130-8.
12. Risacher SL, Saykin AJ, West JD, Shen L, Firpi HA, McDonald BC. Baseline MRI predictors of conversion from MCI to probable AD in the ADNI cohort. *Curr Alzheimer Res* 2009; 6(4): 347-61.
13. Karas GB, Scheltens P, Rombouts SA, Visser PJ, van Schijndel RA, Fox NC, et al. Global and local gray matter loss in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2004; 23(2): 708-16.
14. Luck T, Luppá M, Briel S, Riedel-Heller SG. Incidence of mild cognitive impairment: a systematic review. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2010; 29(2): 164-75.
15. Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C. Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *J Neurosci* 2003; 23(8): 3295-301.
16. Whitwell JL, Petersen RC, Negash S, Weigand SD, Kantarci K, Ivnik RJ, et al. Patterns of atrophy differ among specific subtypes of mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2007; 64(8): 1130-8.
17. Chetelat G, Landeau B, Eustache F, Mezenge F, Viader F, de IS, V, et al. Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study. *Neuroimage* 2005; 27(4): 934-46.
18. Fan Y, Batmanghelich N, Clark CM, Davatzikos C. Spatial patterns of brain atrophy in MCI patients, identified via high-dimensional pattern classification, predict subsequent cognitive decline. *Neuroimage* 2008; 39(4): 1731-43.
19. Ferreira LK, Diniz BS, Forlenza OV, Busatto GF, Zanetti MV. Neurostructural predictors of Alzheimer's disease: a meta-analysis of VBM studies. *Neurobiol Aging* 2011; 32(10): 1733-41.
20. Kovacevic S, Rafii MS, Brewer JB. High-throughput, fully-automated volumetry for prediction of MMSE and CDR decline in mild cognitive impairment. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2009; 23(2): 139-45.

## Diagnosis of Mild Cognitive Impairment (MCI) via Estimating the Density of Gray Matter Using Voxel-Based Morphometry (VBM) in the Brain Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Zahra Karimi<sup>1</sup>, Saeed Kermani PhD<sup>2</sup>, Majid Barekattain MD<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Mild cognitive impairment (MCI) is a transition phase between the normal elderly and dementia which is due to the loss of brain cells, tends to irreversible loss of mental abilities and should be predicted at early stage. Common methods of diagnosis are biochemical and psychological tests. Recently, regarding the developments in analysis of magnetic resonance imaging (MRI), it has been attended as a noninvasive and low-cost method. In this study, we tried to diagnose mild cognitive impairment via estimating the volume of gray matter using voxel-based morphometry (VBM) in brain MRI.

**Methods:** 20 patients with mild cognitive impairment and 20 normal subjects aged  $66.4 \pm 4.6$  and  $65.3 \pm 3.9$  years, respectively, were assessed. All subjects underwent neuropsychological testing using Neuropsychiatry Unit Cognitive assessment tool and were scanned with 1.5T MRI. Images were pre-processed and analyzed using SPM8 running on Matlab<sub>2013b</sub> software. Finally for statistical analyses, modulated images of two groups were compared.

**Findings:** Patients with mild cognitive impairment had significantly lower brain gray matter density in superior frontal gyrus ( $P = 0.013$ ), inferior temporal gyrus ( $P = 0.013$ ), inferior frontal gyrus ( $P = 0.017$ ), paracentral lobule, superior temporal gyrus, paracentral lobule ( $P = 0.022$ ), and insula and middle temporal gyrus ( $P = 0.030$ ).

**Conclusion:** In this study were found several regions of local brain atrophy in patients with mild cognitive impairment within the regions known to be involved in early brain atrophy in mild cognitive impairment that reduce gray matter density.

**Keywords:** Magnetic resonance imaging (MRI), Voxel-based morphometry, Mild cognitive impairment, Gray Matter, Density

**Citation:** Karimi Z, Kermani S, Barekattain M. **Diagnosis of Mild Cognitive Impairment (MCI) via Estimating the Density of Gray Matter Using Voxel-Based Morphometry (VBM) in the Brain Magnetic Resonance Imaging (MRI).** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2204-12

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

2- Assistant Professor, Department of Physics and Medical Engineering, School of Medicine AND Department of Biomedical Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Psychosomatic Research Center AND Department of Psychiatry, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Saeed Kermani PhD, Email: kermani@med.mui.ac.ir



## اسیدهای نوکلئیک جنینی در خون مادر برای تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد

میثم مصالایی<sup>۱</sup>، دکتر رسول صالحی<sup>۲</sup>

## مقاله مروری

## چکیده

تکنیک‌های تهاجمی تشخیص پیش از تولد مثل Chorionic villus sampling (CVS) و آمنیوسنتز دارای هزینه‌ی بالا و خطراتی برای جنین و مادر می‌باشند. مطالعات نشان داده است که اسیدهای نوکلئیک آزاد جنینی در گردش خون مادر وجود دارند. بنا بر این، آزمایش‌ها در سرتاسر دنیا به سمت تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد رفته و نشان داده شده است که این روش‌ها، در مقایسه با روش‌های تشخیص تهاجمی، برتری قابل توجهی از نظر اقتصادی و پزشکی دارد. نکته‌ی مهم در استفاده از اسیدهای نوکلئیک جنینی برای تشخیص پیش از تولد کیفیت قطعات DNA و Messenger RNA (mRNA) به همراه حضور اسیدهای نوکلئیک مادری می‌باشد. آنالیزهای معمول اسیدهای نوکلئیک جنینی، با استفاده از نشانگرهای اختصاصی جنینی در mRNA و DNA انجام می‌شود. این نشانگرهای اختصاصی جنینی شامل تفاوت‌های اپی‌ژنتیک موجود در سلول‌های جنین و مادری است که می‌توان از آن به عنوان نشانگر اختصاصی جنینی استفاده نمود. منبع دیگری که می‌توان آن را به عنوان نشانگر زیستی اختصاصی جنین استفاده نمود، mRNA اختصاصی جنینی می‌باشد. در این زمینه می‌توان از تکنیک‌هایی نظیر Bisulfite sequencing, Digital PCR (Digital polymerase chain reaction) و RT-MLPA (Reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification) استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** تشخیص غیر تهاجمی، DNA آزاد جنینی، پلاسما مادری، آنیوپلوئیدی

**ارجاع:** مصالایی میثم، صالحی رسول. اسیدهای نوکلئیک جنینی در خون مادر برای تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۳): ۲۲۱۸-۲۲۱۳

مختلف تشخیص پیش از تولد دارد.

## مقدمه

تشخیص پیش از تولد به طور کلی به دو دسته‌ی تهاجمی (Invasive) و غیر تهاجمی (Noninvasive) تقسیم می‌شود. از انواع تکنیک‌های تهاجمی می‌توان به آمنیوسنتز، Chorionic villus sampling (CVS) و کوردوسنتز اشاره نمود. زمان طولانی برای دریافت جواب آزمایش تشخیصی (با امکان گذشتن زمان مناسب برای سقط درمانی) (۱-۲)، خطر سقط جنین و هزینه‌ی بالا، از معایب این روش‌ها می‌باشند (۳). روش‌های غیر تهاجمی شامل دو دسته‌ی کلی بررسی سلول‌های جنینی در خون مادر باردار و بررسی اسیدهای نوکلئیک آزاد در خون مادر می‌باشد؛ به کمک این روش‌ها، هم می‌توان تشخیص را در ماه‌های اولیه‌ی بارداری انجام داد و هم خطر سقط جنین را به صفر کاهش داد (۴). این مقاله‌ی مروری، سعی بر ارائه‌ی اطلاعات در زمینه‌ی تاریخیچه، جداسازی اسیدهای نوکلئیک در خون مادر و استفاده از آن در زمینه‌های

## DNA آزاد جنینی در خون مادر

اولین بار DNA جنینی موجود در خون مادر باردار، توسط Lo و همکاران تشخیص داده شد. در مطالعات آنان، با به کارگیری تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) برای تکثیر توالی‌های اختصاصی بر روی کروموزوم Y روی DNA آزاد موجود در خون مادرانی که دارای جنین مذکر بودند، تشخیص ۸۰ درصد وجود DNA پسری در پلاسما خون مادر و تشخیص ۷۰ درصد آن در سرم مادر انجام شد؛ پس از آن با انجام تکنیک Real time PCR روی این نمونه‌ها، حساسیت تشخیص DNA جنینی در پلاسما و سرم مادر، به ۱۰۰ درصد افزایش یافت (۵-۶). این مطالعات توسط سایر دانشمندان نیز مورد تأیید قرار گرفت (۷-۸).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران  
 نویسنده‌ی مسؤو: دکتر رسول صالحی  
 Email: r\_salehi@med.mui.ac.ir

**بیولوژی DNAهای آزاد جنینی**

DNAهای آزاد جنینی موجود در خون مادر در اثر آپوپتوز سلول‌های جفت به ویژه تروفوبلاست‌ها ایجاد می‌شوند (۹-۱۰). این DNAها از هفته ۵ (۱۱) یا ۷ بارداری در خون مادر قابل تشخیص می‌باشند، با افزایش سن بارداری، میزان آن افزایش می‌یابد (۶) و در تمامی زنان باردار، این DNAها وجود دارد. از آن جایی که نیمه‌ی عمر پایین این DNAها در خون مادر که حدود ۱۶ دقیقه می‌باشد و در نهایت حدود ۲ ساعت پس از زایمان به طور کلی از خون مادر حذف می‌شوند، مزاحمتی از بارداری قبلی برای بررسی‌های بارداری فعلی ایجاد نمی‌کنند (۱۲).

DNA آزاد موجود در خون از ۲ منشأ مادری و جنینی می‌باشند که میزان DNA جنینی نسبت به کل، حدود ۳/۴-۶/۲ درصد می‌باشد (۶). با مطالعات بعدی نشان داده شد که میزان این DNAها پس از فرایندهایی مثل آمیوسنتز، افزایش چشمگیری دارد (۱۳). طول قطعات DNA آزاد جنینی، به طور معمول کمتر از ۲۰۰ bp می‌باشد (۱۴-۱۵).

**RNAهای آزاد جنینی**

RNAهای آزاد جنینی موجود در خون مادر، به عنوان سومین منبع ماده‌ی ژنتیک جنینی بعد از سلول‌های جنینی و DNAهای آزاد جنینی به شمار می‌آیند. این RNAها، اولین بار توسط Poon و همکاران تشخیص داده شد. آنان با استفاده از تکنیک RT-PCR و بررسی وجود mRNA (Messenger RNA) ژن ZFY که روی کروموزوم Y قرار دارد، در مادران بارداری که دارای جنین مذکر بودند، به وجود RNA جنینی در خون مادر پی بردند. با توجه به ناپایداری و بیان متفاوت mRNAهای آزاد جنینی، این ماده‌ی ژنتیک تنها در ۲۲ درصد از زنان، در سه ماهه‌ی اول بارداری و تنها در ۶۳ درصد از زنان در سه ماهه‌ی دوم بارداری قابل تشخیص می‌باشد (۱۶).

مقدار RNA جنینی موجود در خون مادر نسبت به DNA جنینی بیشتر است و نسبت به ژن‌های مختلف و افراد مختلف، بیان متفاوت وجود دارد. همچنین، به خاطر ناپایداری و سخت بودن کار با mRNA، مشکلات تکنیکی زیادی در برابر آن وجود دارد. پایداری نسبی mRNAها در خون مادر، به دلیل پوشیده شدن آن‌ها به وسیله‌ی اجسام آپوپتوزی می‌باشد که می‌تواند آن‌ها را به طور نسبی در برابر تخریب شدن محافظت کند (۱۷-۱۸).

**غنی‌سازی و بررسی اسیدهای نوکلئیک جنینی موجود در خون مادر**

از آن جا که DNAهای موجود در خون مادر ترکیبی از DNA جنینی و DNA مادری می‌باشد (۶) و جنین، نیمی از DNA خود را از مادر

به ارث می‌برد، پس تشخیص DNA مادری و جنینی با مشکل روبه‌رو می‌شود. پس از گرفتن نمونه، با گذر زمان به علت آپوپتوز سلول‌های خونی، میزان DNAهای مادری که مزاحم هستند، افزایش می‌یابد. پس در درجه‌ی اول، باید مانع از افزایش DNAهای آزاد مادری شد و هر چه سریع‌تر DNA را از خون مادر جدا نمود. پس از خون‌گیری، برای این که از افزایش DNAهای آزاد مادری جلوگیری شود، می‌توان از فرمالدئید به منظور افزایش استحکام دیواره‌ی سلول‌های خون مادر استفاده نمود تا از آپوپتوز و آزاد شدن DNA مادری جلوگیری گردد (۱۹).

از آن جایی که قطعات DNA جنینی نسبت به DNA مادری اندازه‌ی کوچک‌تری دارد (۱۵)، می‌توان بر اساس تفاوت اندازه‌ی DNA، آن‌ها را از یکدیگر جدا نمود (۲۰، ۱۵-۱۴). هر چند، می‌توان برای جداسازی دقیق‌تر و بهتر، ابتدا DNA جنینی و مادر را با انجام تکنیک تکثیر کلی ژنوم (Whole genome amplification)، افزایش داد و در نهایت، آن‌ها را روی ژل الکتروفورز از هم جدا نمود (۲۱).

**هدف قرار دادن توالی‌های ژنتیک اختصاصی جنین**

گاهی جنین دارای توالی‌هایی اختصاصی است که در مادر وجود ندارد. به عنوان مثال، وقتی جنین دارای کروموزوم Y باشد، با هدف‌گیری توالی‌های مخصوص آن و استفاده از پرایمرهای مخصوص توالی‌های موجود روی این کروموزوم، می‌توان نسبت به تعیین جنسیت جنین اقدام نمود (۲۲، ۵).

همچنین، زمانی که جنین دارای وضعیت گروه خونی Rh مخالف مادر باشد (جنین دارای RhD مثبت و مادر منفی باشد)، می‌توان با هدف قرار دادن توالی ژن RhD به وضعیت Rh جنین پی برد (۲۴-۲۲). در دنبال کردن مستقیم یک سری جهش‌های خاص که در پدر وجود دارد اما در مادر وجود ندارد نیز می‌توان، با بررسی DNAهای آزاد جنینی پی برد که «آیا جنین این نوع جهش خاص پدری را به ارث برده یا نه؟» (۲۵).

به عنوان مثالی از تشخیص پیش از تولد با ردیابی جهش‌های پدری، می‌توان به تشخیص بیماری دیستروفی میوتونی در جنین اشاره نمود (۲۶). از سوی دیگر، به طور غیر مستقیم با ردیابی کروموزوم‌های حاوی ژن بیماری توسط نشانگرهای کروموزومی که در نزدیکی ژن مورد نظر هستند، می‌توان انتقال کروموزوم حاوی ژن بیماری به جنین را تشخیص داد (۲۷-۲۹).

**هدف قرار دادن توالی‌های اپی‌ژنتیک اختصاصی جنین**

هدف قرار دادن توالی‌های اپی‌ژنتیک اختصاصی جنین، روشی است که می‌توان از آن برای تشخیص سندرم‌های آنیپلوئیدی استفاده نمود.

برد (۴۲-۳۹). نخستین mRNAی که به این طریق مورد بررسی قرار گرفت، mRNA ژن Plac4 روی کروموزوم ۲۱ بود که توسط Lo و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (۴۳).

سنجش نرخ mRNA بر پایه‌ی SNP، مستقل از جنسیت، اما وابسته به پلی مورفیسم است؛ از این رو، نیاز به SNPهایی دارد که در مادر و جنین متفاوت باشد (۱۷). از روش‌های جدیدی که با استفاده از SNPهای موجود بر روی این mRNAها، نرخ آلی آن‌ها را تشخیص می‌دهد و در تعیین وضعیت آنیوپلوئیدی استفاده دارد، می‌توان به Reverse transcriptase-multiplex ligation-) RT-MLPA (dependent probe amplification) و Digital PCR اشاره کرد.

### Digital PCR

این روش، بر پایه‌ی رقیق کردن نمونه‌ای است که دارای مقدار کمی از آلل مورد نظر می‌باشد. mRNA ژن Plac4 تبدیل شده به cDNA (complementary DNA)، مثالی از نمونه‌ی مورد استفاده در این روش است که رقیق‌سازی می‌شود. آن گاه، آن را در حجم‌های بسیار کم درون چاهک‌های با اندازه‌ای در حد میکرون قرار می‌دهند که در این چاهک‌ها پرایمر برای SNPهای مورد نظر و پروب‌های مخصوص برای گزارش انجام واکنش PCR وجود دارد. از آن جایی که مقدار نمونه، کم و ضریب رقیق‌سازی بالا می‌باشد، در نتیجه تعداد کمی از نسخه‌های آلل نادر مورد نظر وارد چاهک می‌شود (به طور معمول ۱ نسخه) که با شمارش چاهک‌هایی که در آن واکنش PCR صورت گرفته نسبت به کل چاهک‌ها و مقایسه‌ی آن با حالت طبیعی، می‌توان به وجود سندرم‌های آنیوپلوئیدی پی برد. مزیت Digital PCR این است که دقت و صحت نتایج آن نسبت به روش Real time PCR بالاتر است و نیاز به یک ژن شاهد داخلی برای طبیعی‌سازی اطلاعات ندارد (۴۴، ۳۹).

### RT-MLPA

این روش، در واقع ترکیبی از روش‌های RT-PCR و MLPA می‌باشد. در این سیستم، ابتدا mRNA به روش RT-PCR به cDNA تبدیل می‌شود. سپس، به منظور بررسی SNPهای مختلف، از پروب‌های متفاوت استفاده می‌گردد و میزان این پروب‌ها، در صورت تکثیر شدن با حالت طبیعی مقایسه می‌شود؛ به این ترتیب، از آن برای تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی می‌توان استفاده کرد (۴۵).

### نتیجه‌گیری

استفاده از اسیدهای نوکلئیک آزاد جنینی موجود در خون مادر باردار، به عنوان یک روش تشخیص غیر تهاجمی پیش از تولد است. این

این روش، بر پایه‌ی تفاوت الگوی متیلاسیون جنین و مادر می‌باشد (۱۶). اولین مطالعات در این زمینه، توسط Chim و همکاران بر روی پروموتور ژن maspin که روی کروموزوم ۱۸ قرار دارد، صورت گرفت. در این مطالعه، با مقایسه‌ی الگوی متیلاسیون بافت جنینی و خون مادر با روش تیمار با بیسولفیت و بررسی تفاوت متیلاسیون (با توجه به این که این توالی در جنین، هایپومتیله و در مادر به صورت هایپومتیله می‌باشد) و نیز با سنجش نرخ آلی توالی‌های هایپومتیله و مقایسه با حالت طبیعی، به وضعیت تریزومی یا دیزومی بودن کروموزوم ۱۸ پی بردند (۳۰). حساسیت این روش ۱۰۰٪ و موارد مثبت کاذب (False positive) آن ۹/۷ درصد بود (۳۱).

این روش، اگر چه مستقل از جنسیت و مستقل از نشانگرهای پلی مورفیسمی است، اما چون تیمار با بیسولفیت سبب تخریب مقدار زیادی از DNAهای جنینی هایپومتیله می‌شود، نیاز به مقدار زیادی از DNA جنینی می‌باشد (۳۲)؛ برای حل این مشکل، می‌توان از نشانگرهای اپی ژنتیک استفاده نمود که در جنین، هایپومتیله و در مادر، هایپومتیله می‌باشد. تعدادی از این نشانگرهای اپی ژنتیک، روی سایر کروموزوم‌ها به ویژه کروموزوم‌های ۲۱، ۱۸ و Y شناسایی شدند و از آن‌ها برای بررسی وجود سندرم‌های کروموزومی استفاده شده است (۳۳-۳۷).

از روش‌های جدیدی که می‌توان با استفاده از تفاوت الگوی متیلاسیون در جنین و مادر، در تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی از آن استفاده کرد، روش Real time PCR به همراه Medip on chip (Methylated DNA Immunoprecipitation) می‌باشد. به این صورت که ابتدا با روش Medip on chip، نواحی که در آن‌ها DNA جنینی هایپومتیله و مادر هایپومتیله است، شناسایی می‌شوند. آن گاه با استفاده از روش Medip به همراه Real time PCR، تفاوت توالی این مناطق از نظر الگوی متیلاسیون، بررسی و با حالت طبیعی آن‌ها مقایسه می‌شود و با گذاشتن یک حد آستانه‌ای (Threshold) برای آن، می‌توان به وضعیت تعدادی کروموزوم‌ها پی برد (۳۸).

### هدف قرار دادن mRNAهای اختصاصی جنین

روش دیگری که می‌توان از آن برای تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی استفاده کرد، بررسی mRNAهایی است که به طور اختصاصی در جنین بیان می‌شوند؛ به طوری که با مشخص نمودن منشأ این mRNAها به کمک ردیابی آن‌ها با استفاده از نشانگرهایی مثل SNPها (Single nucleotide polymorphisms) که در سطح آن‌ها وجود دارد، و مقایسه‌ی مقداری این mRNAها در حالت طبیعی و آزمایش، می‌توان به وضعیت تعدادی کروموزومی که از آن منشأ گرفته‌اند، پی

حد ممکن (۴۶-۴۷)، در آینده‌ای نه چندان دور می‌تواند به طور کامل جایگزین روش‌های تهاجمی شود و به عنوان یکی از روش‌های قطعی تشخیص پیش از تولد مورد استفاده قرار گیرد.

روش‌ها، با توجه به نداشتن هیچ گونه خطر برای جنین و مادر، قابلیت استفاده از روش‌های نوینی همچون Next generation sequencing و نیز افزایش حساسیت و اختصاصیت روش‌های تشخیصی تا بالاترین

## References

- Dey M, Sharma S, Aggarwal S. Prenatal screening methods for aneuploidies. *N Am J Med Sci* 2013; 5(3): 182-90.
- Kuliev AM, Modell B, Jackson L, Simpson JL, Brambati B, Rhoads G, et al. Risk evaluation of CVS. *Prenat Diagn* 1993; 13(3): 197-209.
- Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta* 2004; 25(Suppl A): S93-S101.
- Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006; 45(1): 10-20.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350(9076): 485-7.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62(4): 768-75.
- Smid M, Lagona F, de Benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clin Chem* 1999; 45(9): 1570-2.
- Houfflin-Debarge V, O'Donnell H, Overton T, Bennett PR, Fisk NM. High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnested PCR in maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 2000; 15(2): 102-7.
- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel HM, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007; 27(5): 415-8.
- Watanagata T, Metzenbauer M, Peter I, Johnson KL, Bianchi DW. Placental volume, as measured by 3-dimensional sonography and levels of maternal plasma cell-free fetal DNA. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193(2): 496-500.
- Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005; 51(2): 312-20.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64(1): 218-24.
- Samura O, Miharu N, Hyodo M, Honda H, Ohashi Y, Honda N, et al. Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis. *Clin Chem* 2003; 49(7): 1193-5.
- Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50(1): 88-92.
- Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010; 2(61): 61ra91.
- Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46(11): 1832-4.
- Go AT, van Vugt JM, Oudejans CB. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum Reprod Update* 2011; 17(3): 372-82.
- Bianchi DW, Maron JL, Johnson KL. Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. *Early Hum Dev* 2010; 86(11): 747-52.
- Dhalla R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004; 291(9): 1114-9.
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004; 50(6): 1002-11.
- Jorgez CJ, Bischoff FZ. Improving enrichment of circulating fetal DNA for genetic testing: size fractionation followed by whole gene amplification. *Fetal Diagn Ther* 2009; 25(3): 314-9.
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 2000; 107(6): 766-9.
- Lo YM. Noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis: a review of the current state of the art. *BJOG* 2009; 116(2): 152-7.
- Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van KC, Raynal V, van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991; 78(10): 2747-52.
- Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1): 139-51.
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46(2): 301-2.

27. Tang NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YM. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. *Clin Chem* 1999; 45(11): 2033-5.
28. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 2000; 106(1): 45-9.
29. Chen CP, Chern SR, Wang W. Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. *Prenat Diagn* 2000; 20(4): 355-7.
30. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(41): 14753-8.
31. Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. *Clin Chem* 2006; 52(12): 2194-202.
32. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(13): E65.
33. Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, et al. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem* 2008; 54(3): 500-11.
34. Old RW, Crea F, Puszyk W, Hulten MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online* 2007; 15(2): 227-35.
35. Tong YK, Jin S, Chiu RW, Ding C, Chan KC, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clin Chem* 2010; 56(1): 90-8.
36. Brown L, Brown G, Vacek P, Brown S. Aneuploidy detection in mixed DNA samples by methylation-sensitive amplification and microarray analysis. *Clin Chem* 2010; 56(5): 805-13.
37. Papageorgiou EA, Karagrorgiou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 2011; 17(4): 510-3.
38. Patsalis PC, Tsaliki E, Koumbaris G, Karagrorgiou A, Velissariou V, Papageorgiou EA. A new non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome through epigenetic markers and real-time qPCR. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12(Suppl 1): S155-S161.
39. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(32): 13116-21.
40. Tsui NB, Wong BC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn* 2009; 29(11): 1031-7.
41. Go AT, Visser A, Mulders MA, Twisk JW, Blankenstein MA, van Vugt JM, et al. C21ORF105, A chromosome 21-encoded mRNA, is not a discriminative marker gene for prediction of Down syndrome in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007; 27(2): 146-9.
42. Go AT, Visser A, Mulders MA, Blankenstein MA, van Vugt JM, Oudejans CB. 44 single-nucleotide polymorphisms expressed by placental RNA: assessment for use in noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Clin Chem* 2007; 53(12): 2223-4.
43. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13(2): 218-23.
44. Chiu RW, Cantor CR, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet* 2009; 25(7): 324-31.
45. Li PQ, Zhang J, Fan JH, Zhang YZ, Hou HY. Development of noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by RT-MLPA with a new set of SNP markers. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289(1): 67-73.
46. Xu L, Shi R. Noninvasive prenatal diagnosis using next-generation sequencing. *Gynecol Obstet Invest* 2014; 77(2): 73-7.
47. Pappasavva T, van Ijcken WF, Kockx CE, van den Hout MC, Kountouris P, Kythreotis L, et al. Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to beta-thalassaemia. *Eur J Hum Genet* 2013; 21(12): 1403-10.

## Fetal Nucleic Acids in Maternal Circulation for Noninvasive Prenatal Diagnosis

Meysam Mosallayi<sup>1</sup>, Rasoul Salehi PhD<sup>2</sup>

### Review Article

#### Abstract

Invasive techniques of prenatal diagnosis such as amniocentesis and chorionic villus sampling (CVS) are expensive and associated with risks to the mother and the fetus. Studies show that cell-free nucleic acids circulate freely in maternal blood. Therefore, the experiments performed worldwide towards noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) have demonstrated great economical and medical benefits compared to the currently used invasive prenatal diagnostic techniques. The important point of using cell-free nucleic acids in maternal plasma for prenatal diagnosis is quality of the recovered DNA and messenger RNA (mRNA) fragments in conjunction with presence of maternal nucleic acids. The current analysis of fetal nucleic acids in maternal plasma is done via using fetal specific DNA and mRNA markers. Using the fetal-specific markers includes epigenetic differences between the placenta and maternal blood cells that could be used as a fetal-specific marker and also fetal-specific mRNA in maternal plasma that provides another source of fetal specific biomarkers. Techniques such as bisulfite sequencing, digital polymerase chain reaction (Digital PCR) and reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) are used in these cases, too.

**Keywords:** Noninvasive diagnosis, Cell-free fetal DNA, Maternal plasma, Aneuploidy

**Citation:** Mosallayi M, Salehi R. **Fetal Nucleic Acids in Maternal Circulation for Noninvasive Prenatal Diagnosis.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(363): 2213-8

1- MSc Student, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

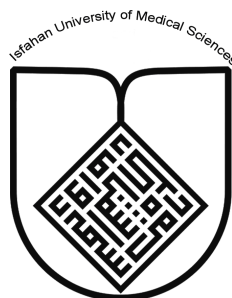
**Corresponding Author:** Rasoul Salehi PhD, Email: r\_salehi@med.mui.ac.ir



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





## JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 33, No. 363, 3<sup>rd</sup> Week February 2016

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

Associate Editor: **Maryam Radahmadi PhD**

---

### Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

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

### Office:

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

Telefax: +98 31 37922291

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

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

Office Secretary: Golnaz Rajabi

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

Farzanegan Radandish Co.

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

Telefax: +98 31 36686302

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

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

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

Circulation: 500

---

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

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

---

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

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