



## مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۵۵)، بهمن‌سوم آذر ۱۳۹۴

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

### ناشر:

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

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

E-mail: publications@mui.ac.ir

دفتر مجله: دانشکده پزشکی      صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶

مسئول دفتر: گلناز رجبی

دورنگار: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۲۹۱

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 فرزانتگان 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 نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

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

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

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

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

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

#### **اگر منبع مورد نظر مقاله است:**

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

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

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

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

#### **اگر منبع مورد نظر کتاب است:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## فهرست مطالب

### مقاله‌های پژوهشی

- ۱۷۴۰.....بهبودسازی تولید یک آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه علیه گیرنده‌ی لپتین و CD4 انسانی و بررسی خواص آن.....  
لیلا ممجدی، دکتر سید حمید زرکش اصفهانی، دکتر محمد ربانی، دکتر رحمان امامزاده، فروزان صفری، دکتر آرش بابایی
- ۱۷۵۲.....بررسی مقایسه‌ای تأثیر تجویز داروهای ممانتین و پیراستام بر شدت آفازی متعاقب سکتته‌ی مغزی.....  
دکتر فریبرز خوروش، دکتر مجید قاسمی، مرضیه نادری، امید میرمسیب
- ۱۷۵۸.....تأثیر محدودیت غذایی دراز مدت بر آپوپتوز میوکارد.....  
دکتر افشار جعفری، حسن پوررضی، دکتر سعید نیکوخصلت، دکتر بهزاد برادران
- بررسی تأثیر مکمل اسفرزه (Psyllium) همراه با رژیم کاهش وزن بر شاخص‌های آنتروپومتریک و آنزیم‌های کبدی در بزرگسالان چاق یا  
دارای اضافه وزن.....  
۱۷۷۱.....  
زهرا اکبرزاده، دکتر مژگان نوریان، دکتر غلامرضا عسگری، دکتر محمدرضا مرآئی، دکتر رحمت‌اله رفیعی

### مقاله کوتاه

- ۱۷۸۴.....بررسی اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت در استان اصفهان در سال ۱۳۹۱.....  
مهدی محمدیان، حمید صالحی‌نیا، سلمان خزایی، جواد رمضان‌پور، عبدالله محمدیان هفشجانی

## بهینه‌سازی تولید یک آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه علیه گیرنده‌ی لپتین و CD4 انسانی و بررسی خواص آن

لیلا ممجدی<sup>۱</sup>، دکتر سید حمید زرکش اصفهانی<sup>۲</sup>، دکتر محمد ربانی<sup>۳</sup>، دکتر رحمان امامزاده<sup>۴</sup>،  
فروزان صفری<sup>۱</sup>، دکتر آرش بابایی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** نقص در لپتین و یا گیرنده‌ی آن، اثر محافظتی در ابتلا به بیماری‌های خودایمن دارد؛ اما از آن جایی که لپتین روی سلول‌های بسیاری دارای گیرنده است، مسدود کردن همه‌ی آن‌ها عواقبی را به دنبال خواهد داشت. بنا بر این، آنتاگونیست لپتین در فرم قطعه‌ای آنتی‌بادی با ویژگی دوگانه (taFv) علیه CD4 و گیرنده‌ی لپتین ObR، از طریق هدف قرار دادن ObR فقط بر روی سلول‌های T، دارای پتانسیل درمانی برای چنین بیماری‌هایی است. این پژوهش با هدف افزایش بیان taFv مذکور انجام شد.

**روش‌ها:** قطعه‌ی ژنی taFv، از وکتور pAB1 به وکتور pET32a ساب‌کلون شد. واکنش PCR (Polymerase chain reaction) به منظور تأیید ورود قطعه انجام گرفت. تأیید تولید پروتئین با روش‌های Dot blot، SDS PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و Western blot انجام گرفت. تأثیر شرایط مختلف محیطی شامل محیط کشت، سویه‌ی باکتریایی، دما و غلظت Isopropyl β-D-1- IPTG (thiogalactopyranoside) بر روی بیان از طریق ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) آزمایش شد. در نهایت، خاصیت زیستی پروتئین تولید شده به روش فلوسایتمتری بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج PCR، حضور taFv را در پلاسمیدهای ساب‌کلون شده تأیید کرد. آزمایش‌های Dot blot، به وضوح افزایش بیان پروتئین را در مقایسه با وکتور قبلی و آزمایش ELISA، محیط سوربیتول‌دار، دمای ۱۸ °C، سویه‌ی E. coli BL21 (Escherichia coli) و غلظت ۰/۰۵ IPTG mM را مناسب‌تر از سایر سطوح برای بیان پروتئین نشان داد. فلوسایتمتری قابلیت اتصال taFv تولید شده به حدود ۲۰ درصد از لنفوسیت‌ها را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** امکان تولید taFv به صورت نوترکیب با قابلیت اتصال به مولکول CD4 روی لنفوسیت‌های انسان وجود دارد. همچنین، با بهینه‌سازی شرایط تولید، امکان افزایش تولید آن فراهم می‌شود.

**واژگان کلیدی:** لپتین، بیماری‌های خودایمن، بهینه‌سازی، آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه

**ارجاع:** ممجدی لیلا، زرکش اصفهانی سید حمید، ربانی محمد، امامزاده رحمان، صفری فروزان، بابایی آرش. بهینه‌سازی تولید یک آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه علیه گیرنده‌ی لپتین و CD4 انسانی و بررسی خواص آن. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۵):

۱۷۴۰-۱۷۵۱

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

## مقدمه

لپتین هورمونی غیر گلیکوزیله با ۱۶۷ اسید آمینه (۱)، دارای ساختاری استوانه‌مانند، متشکل از ۴ زنجیره‌ی آلفای آنتی‌پارالل با اتصالات عرضی است، که نقش کلیدی در جذب و مصرف انرژی و یا به بیان دیگر، اشتها و متابولیسم دارد (۲). در پی غذا خوردن، سطح لپتین سرم افزایش می‌یابد که منجر به ارسال علامتی به سیستم اعصاب مرکزی (CNS یا Central nervous system)، مبنی بر کافی بودن انرژی می‌گردد که به دنبال آن، پاسخ به صورت کاهش اشتها و افزایش مصرف انرژی داده می‌شود تا از چاقی جلوگیری گردد (۳).

لپتین روی غدد آدرنال، هیپوفیز و هیپوتالاموس اثر می‌گذارد و یک هورمون چند منظوره است. علایم‌دهی گیرنده‌ی لپتین، نقش اساسی در رگ‌زایی، تومورزایی، میزان انسولین خون و دیابت نوع II، تشکیل استخوان، فشار خون، بلوغ جنسی و باروری بازی می‌کند (۳).

به طور عمده، از آدیپوسیت‌ها (بافت سفید چربی)، به تناسب حجم چربی بدن (۴، ۲)، و به میزان بسیار کمتر از سلول‌های اپی‌تلیال معده، اپی‌تلیال پستان، عضلات اسکلتی و جفت ترشح می‌شود. بیان لپتین، تحت تأثیر هورمون‌هاست. انسولین، ترشح لپتین را در طول تغذیه تحریک می‌کند؛ در حالی که در گرسنگی کاهش انسولین با کاهش لپتین همراه است. تستوسترون بیان لپتین را مهار می‌کند، اما هورمون‌های جنسی استروئیدی منجر به افزایش لپتین می‌گردند. میزان لپتین سرمی با میزان چربی ذخیره شده در بدن ارتباط مستقیم دارد (۵). گیرنده‌ی لپتین (ObR) با ژن db بیان می‌شود و

۶ ایزوفرم از آن وجود دارد (۶، ۲).

اختلال در بیان ژن لپتین (ob) یا اختلال در گیرنده‌ی آن (db) و یا نقص در مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی، پیامدهایی نظیر اشتیاق پایدار به غذا و چاقی مفرط را در پی دارد (۷). از جمله اثرات مهم لپتین، اثر آن روی سیستم ایمنی است. موش‌های ob/ob یا db/db (که به ترتیب دچار نقص در تولید هورمون و یا گیرنده‌ی آن می‌باشند)، نه تنها چاق هستند، بلکه در عملکرد فعالیت‌های جنسی، سطح هورمونی، ترمیم زخم، ساختمان استخوانی و عملکرد سیستم ایمنی هم، غیر طبیعی می‌باشند (۸). همچنین، متحمل آتروفی تیموس و کاهش تعداد لنفوسیت‌ها هستند (۹). این موش‌ها دچار نقص در ایمنی سلولی و هومورال هستند (۱۰).

موش‌های دچار نقص لپتین، به القای دو نوع EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) فعال و اکتسابی (مدل حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس) مقاومت دارند که این مقاومت با تجویز لپتین قابل برگشت است و می‌توان آن‌ها را بدین طریق حساس نمود. در این بازگشت، پاسخ‌های نوع  $Th_2$  ( $T$  helper<sub>2</sub>) به  $Th_1$  و  $IgG_1$  (Immunoglobulin G<sub>1</sub>) به  $IgG_{2a}$  سوئیچ می‌شود. سلول‌های  $CD4^+$  T، موش که تحت تأثیر آنتاگونیست‌های لپتین قرار گرفتند، یک کاهش حساسیت نسبت به پپتید عامل القای EAE از خود نشان دادند (۱۱). در نتیجه، با ایجاد آنتاگونیستی برای ممانعت از عمل لپتین بر سلول‌ها، تا حد زیادی می‌توان بیماری‌های خود ایمن را از بین برد. این کار با ایجاد Ab (Antibody) کامل یا مشتقات آن مثل ScFv علیه لپتین، گیرنده‌اش و یا مسیر داخل سلولی



پپتید حد واصل طراحی شده است. جایگاه اتصال یک سمت از این آنتی‌بادی، گیرنده‌ی هورمون لپتین است که به عنوان آنتاگونیست گیرنده عمل می‌کند و سمت دیگر، قادر به اتصال به CD4 لنفوسیت‌های انسانی می‌باشد. با اتصال این taFv هم‌زمان به دو جایگاه پیش‌گفته، هدف اصلی که مسدود کردن گیرنده‌ی لپتین فقط بر روی لنفوسیت‌های T است، صورت می‌گیرد (۱۶). هدف از این مطالعه، افزایش تولید taFv بود.

### روش‌ها

برای دستیابی به بیان مناسب که هدف این مطالعه بود، قطعه‌ی taFv از وکتور pAB1 (دارای اپران و پروموتور lac و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین) همراه قطعه‌ی pel B (توالی رهبر که باعث هدایت پروتئین به فضای پری‌پلاسمی می‌شود) به وکتور pET32a انتقال داده شد. وکتور pET32a، دارای پروموتور T7، اپران lac، دنباله‌ی His (به منظور ردیابی پروتئین توسط آنتی‌بادی و خالص‌سازی)، دنباله‌ی Trx (به منظور محلول ساختن پروتئین) و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود. به منظور ساب‌کلون، هر دو وکتور مبدأ (pAB1) و هدف (pET32a) با آنزیم‌های NotI و HindIII در واکنش Double digest بریده شد و پس از استخراج از ژل، قطعه‌ی taFv (همراه با قطعه‌ی pel B چسبیده به آن)، واکنش الحاق بین قطعه و وکتور هدف با کمک آنزیم DNA لیگاز T4 صورت گرفت.

همچنین، برای بررسی خود الحاقی وکتور هدف، انکوباسیون وکتور هدف و آنزیم DNA لیگاز T4، بدون قطعه‌ی taFv، نیز انجام شد. سلول‌های

(JAK2 و فسفوتیروزین کیناز)، امکان پذیر است که البته به کار بردن Ab علیه مورد آخر، با توجه به گسترده‌ی مسیر JAK/STAT (Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription) باعث اختلالات عمده در عملکرد سلول می‌شود (۱۲).

آنتی‌بادی‌ها، به خصوص در فرم‌های مهندسی شده، ابزارهای قدرتمندی برای شناسایی، تشخیص و درمان هستند (۱۳).

از معایب تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری‌ها، فقدان سیستم‌های قندگذاری و عدم وجود سیستم‌های تولید و ترشح مشابه سلول‌های پستانداران است. کوچک کردن Ab، تنها از طریق تولید قسمت‌های عملکردی آن (یا تولید قسمت‌های Variable سنگین و سبک) تا حدی این مشکل را برطرف می‌کند؛ یعنی به جای تولید آنتی‌بادی کامل، قطعات Ab مثل Fab، ScFv، SdAb (Nanobody) تولید شود. ScFv از اتصال دومین‌های متغیر زنجیره‌ی سنگین و سبک ( $V_L$  و  $V_H$ )، با پپتید قابل انعطاف تشکیل شده است. این قطعات، ضمن حفظ خاصیت اتصال به آنتی‌ژن (Ag یا Antigen) می‌توانند به سهولت در سلول‌های باکتری تولید شوند (۱۴) و چون گلیکوزیلاسیون Ab‌ها در زنجیره‌ی ثابت سنگین ( $C_H$  یا  $Chain_{Heavy}$ ) انجام می‌شود، تولید قطعات مزبور نیاز به گلیکوزیلاسیون هم ندارد (۱۵). از آن جایی که لپتین هورمون چند منظوره و دارای نقش‌های متعدد است، به منظور مسدود کردن گیرنده‌ی لپتین فقط بر روی لنفوسیت‌های T، قطعه‌ای آنتی‌بادی (taFv یا Tandem scFv یا Tandem single chain fragment variable) با اختصاصیت دوگانه از طریق اتصال دو scFv به کمک

این محیط به ۱۵ ml محیط کشت جدید (نسبت ۱ به ۱۰۰)، حاوی ۱۰۰ µg/ml آمپی‌سیلین اضافه و در دمای ۳۷ °C و انکوباتور Shaker با دور ۱۸۰ rpm تا زمانی که OD (Optical density) به ۰/۸-۰/۶ (ابتدای مرحله‌ی لگاریتمی) برسد، انکوبه و سپس ۱ mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) اضافه و در دمای ۲۳ °C و انکوباتور شیکردار با دور ۱۸۰ rpm، به مدت ۲۰-۱۸ ساعت بار دیگر انکوبه شد.

به منظور بررسی حضور پروتئین، اقدام به جداسازی عصاره‌های پری‌پلاسم و سیتوپلاسم شد. برای دستیابی به عصاره‌ی پری‌پلاسم، از شیب سوکروز یعنی بافر ۱x و ۱/۵ x TES (۲۰ درصد Sucrose، ۱ mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)، ۲۰ mM Tris-HCl) و برای دستیابی به عصاره‌ی سیتوپلاسمی از امواج اولتراسوند (Hielscher, Germany)، استفاده شد.

به منظور بررسی حضور پروتئین به کمک آنتی‌بادی Anti-His tag (Sigma-Aldrich)، از عصاره‌های پری‌پلاسم و سیتوپلاسم استخراج شده در Dot blot استفاده شد و پس از آن، SDS PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و Western blot نیز انجام گرفت.

برای مشخص کردن تأثیر شرایط محیطی، ۱۸ آزمایش طراحی شده توسط نرم‌افزار Minitab ۱۶، با سه بار تکرار انجام شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

به منظور خالص‌سازی از سویه‌ای که بیشترین تولید را داشت، E. coli BL21، ۲۰۰ ml در شرایط

E. coli TOP 10 (Escherichia coli) با روش CaCl<sub>2</sub> و شوک حرارتی (بر اساس پروتکل Sambrook) مستعد پذیرفتن پلاسمید شدند. سپس، با محصول واکنش الحاق و خود الحاقی، ترانسفورم در محیط LB (Luria broth) آگار حاوی ۱۰۰ µg/mg آمپی‌سیلین کشت داده شدند. بر روی محصول واکنش الحاق، پس از استخراج پلاسمید (از طریق کیت شرکت فرمتاز)، به منظور تأیید دریافت قطعه‌ی taFv، با کمک پرایمرهای عمومی pET (پرایمرهای T7) واکنش Polymerase chain reaction (PCR) انجام شد.

غلظت مواد موجود در واکنش PCR شامل ۲/۵ µl بافر PCR 10X، ۰/۷۵ µl MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ µl dNTP (Deoxynucleoside triphosphate)، Forward primer و Reverse primer هر کدام ۰/۵ µl، ۰/۲ µl آنزیم pET32a دارای قطعه‌ی taFv و آب ۱۸/۲۵ µl بود که تحت برنامه‌ی ۹۵ °C در ۳ دقیقه، ۹۵ °C در ۱ دقیقه، ۵۷ °C در ۱ دقیقه، ۷۲ °C در ۲/۴ دقیقه، ۷۲ °C در ۳ دقیقه و در ۳۰ چرخه انجام گرفت. بررسی محصول نهایی PCR از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید و مشاهده‌ی آن با نشانگر ۱ kb در دستگاه Gel documentation انجام شد.

پس از تأیید ایجاد پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه‌ی taFv، شرایط برای بیان آماده شد. به این ترتیب که چند کلونی از باکتری‌های E. coli BL21، JM109 و Origami ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب، در ۵ ml محیط LB مایع حاوی ۱۰۰ µg/mg آمپی‌سیلین، در دمای ۳۷ °C و انکوباتور شیکردار کشت شبانه داده شدند. سپس ۱۵۰ µl از

به طور خلاصه، لئوسیت‌ها و taFv همراه Mouse anti His-Tag Ab یا آنتی‌بادی شاهد ایزوتایپ، در ابتدا و سپس همراه Anti-mouse FITC (abcam) در دو لوله‌ی مجزا و در لوله‌ی دیگر به عنوان شاهد مثبت لئوسیت‌ها بدون حضور taFv، با آنتی‌بادی تجاری Anti-human CD4 FITC (CMG) یا Cyto Matin Gene (به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق تاریک انکوبه شدند. نمونه‌ها پس از شستشو با PBS (Phosphate-buffered saline)، از طریق دستگاه فلوسایتومتری (Partec PAS, Germany) آنالیز شد.

هوادهی بالا کشت و عصاره‌های پری‌پلاسم و سیتوپلاسم باکتری‌ها پس از استحصال، طبق پروتکل شرکت اینویترژن از ستون نیکل عبور داده شد. خاصیت زیستی، از طریق بررسی اتصال taFv خالص شده به CD4 سطح لئوسیت‌ها به کمک آنتی‌بادی‌های Mouse anti His-Tag Ab، آنتی‌بادی شاهد ایزوتایپ (Amersham)، Anti-mouse FITC (Anti-mouse fluorescein isothiocyanate) از (abcam) و Anti-human CD4 FITC (CMG) از طریق تکنیک فلوسایتومتری سنجش شد.

جدول ۱. ۱۸ آزمایش طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار Minitab ۱۶

Strain	Media	Tem (°C)	[IPTG] M
BL21	TB	۱۸	۰/۰۵
Origami	TB	۲۳	۰/۱۰
JM109	TB	۳۰	۱/۰۰
BL21	LB sorbitol	۱۸	۰/۱۰
Origami	LB sorbitol	۲۳	۱/۰۰
JM109	LB sorbitol	۳۰	۰/۰۵
Origami	SB sorbitol	۱۸	۰/۰۵
JM109	SB sorbitol	۲۳	۰/۱۰
BL21	SB sorbitol	۳۰	۱/۰۰
JM109	LB glycine-triton x-100	۱۸	۱/۰۰
BL21	LB glycine-triton x-100	۲۳	۰/۰۵
Origami	LB glycine-triton x-100	۳۰	۰/۱۰
Origami	SB glycine-triton x-100	۱۸	۱/۰۰
JM109	SB glycine-triton x-100	۲۳	۰/۰۵
BL21	SB glycine-triton x-100	۳۰	۰/۱۰
JM109	TB ethanol	۱۸	۰/۱۰
BL21	TB ethanol	۲۳	۱/۰۰
Origami	TB ethanol	۳۰	۰/۰۵

TB: محیط TB حاوی گلیسرول ۰/۶ M، LBs: محیط LB حاوی سوربیتول ۰/۵ M، SBs: محیط SB حاوی سوربیتول ۰/۵ M، LBg.t: محیط LB حاوی گلايسين و تريتون ۱۰۰-X هر کدام ۱ درصد، SBg.t: محیط SB حاوی گلايسين و تريتون ۱۰۰-X هر کدام ۱ درصد، TB ethanol: محیط TB که علاوه بر گلیسرول ۰/۶ M، حاوی اتانول ۳ درصد نیز بود.

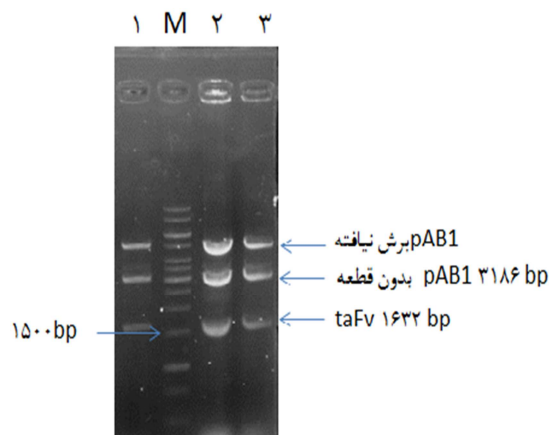
جدول ۲. آماده‌سازی (تیمار) سلول‌های لنفوسیت با آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

مرحله سوم	مرحله دوم	مرحله اول		شماره لوله	
		آنتی‌ژن	لنفوسیت		
-	-	taFv	+	۱	اتوفلورسنت
Anti-mouse FITC	Mouse anti His-Tag Ab	taFv	+	۲	نمونه‌ی اصلی
Anti-mouse FITC	آنتی‌بادی شاهد ایزوتایپ	taFv	+	۳	ایزوتایپ شاهد
Anti-mouse FITC	-	taFv	+	۴	FITC شاهد
Anti-human CD4 FITC	-	-	+	۵	شاهد مثبت

FITC: Fluorescein isothiocyanate

### یافته‌ها

هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده‌ی NotI و HindIII بر روی پلاسمید pAB1، خروج قطعه‌ی ۱۶۳۲ bp taFv همراه با pelB را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱. هضم دوگانه‌ی آنزیمی پلاسمید pAB1 و خروج قطعه‌ی taFv

M، نشانگر ۱ kb، چاهک‌های شماره‌ی ۱، ۲ و ۳ پلاسمید pAB1 برش یافته با آنزیم‌های محدود کننده‌ی NotI و HindIII (در بافرهای مختلف) می‌باشد. طول قطعه‌ی ژنی taFv، ۱۶۳۲ bp و طول باقی‌مانده‌ی پلاسمید pAB1، ۳۱۸۶ bp بود.

باکتری‌هایی که با پلاسمید نوترکیب (محصول الحاق pET32a و قطعه‌ی taFv) ترانسفورم شده بودند، تعداد زیاد کلونی و باکتری‌هایی که با پلاسمید Double digest pET32a شده (محصول واکنش

به منظور بررسی خاصیت زیستی، اتصال taFv خالص شده به CD4 سطح لنفوسیت‌ها به کمک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق جدول ۲، لوله‌ی شماره‌ی ۱ فقط دارای لنفوسیت و taFv و به عنوان اتوفلورسنت انتخاب شد. آماده‌سازی سایر لوله‌ها بدین ترتیب بود: در مرحله‌ی اول انکوباسیون، بر روی لنفوسیت‌های لوله‌های شماره‌ی ۲ تا ۴ که به ترتیب، نمونه‌ی اصلی، شاهد ایزوتایپ و شاهد FITC بود؛ taFv، در مرحله‌ی دوم انکوباسیون به لوله‌ی شماره‌ی ۲ Mouse anti His- Tag Ab و به لوله‌ی شماره‌ی ۳ آنتی‌بادی شاه ایزوتایپ (Amersham) و در مرحله‌ی سوم انکوباسیون، به لوله‌های شماره‌ی ۲، ۳ و ۴ Anti-mouse FITC (abcam) و به لوله‌ی شماره‌ی ۵ که کنترل مثبت بود، Anti-human CD4 FITC (CMG) اضافه شد. تمام انکوباسیون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ و در صورت داشتن ماده‌ی فلورسنت، در تاریکی انجام گرفت و بین تمام انکوباسیون‌ها و همچنین بعد از آخرین مرحله، شستشو با PBS، به صورت ۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۴۰۰ g انجام شد (۱۷). میزان فلورسنت نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (Partec PAS, Germany) آنالیز شد.

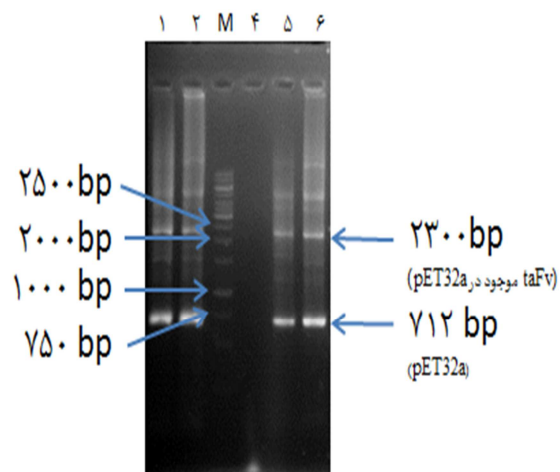
نتایج Dot blot، بازگو کننده‌ی تولید پروتئین در تمام عصاره‌های پری‌پلاسما و سیتوپلاسما فقط در سویه‌ی E.coli BL21 بود (شکل ۳).  
در Western blot و SDS PAGE، باند ۷۸ kDa مربوط به taFv ظاهر شد (شکل‌های ۴ و ۵).

خودالحاقی) ترانسفورم شدند، ۳ کلونی بر روی پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین تشکیل دادند.  
نتایج PCR به کمک پرایمرهای T7 بر روی پلاسמיד نو ترکیب استخراج شده، تکثیر قطعه‌ی ۲۳۰۰ bp (taFv و pelB) را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۳. نتایج حاصل از Dot blot عصاره‌ی سیتوپلاسمی و پری‌پلاسمی از طریق آنتی‌بادی Anti His- HRP

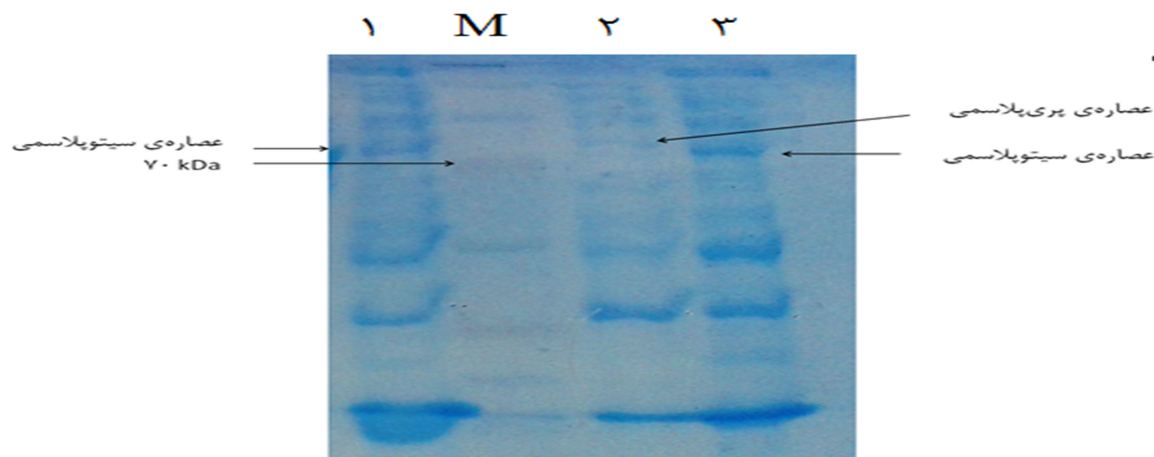
۱ و ۲) شاهد مثبت: پروتئین دیفنسین (دارای دنباله‌ی هیستیدین) تولید شده در وکتور (pET 48b، ۳) شاهد منفی، ۴ و ۵) نمونه‌های پری‌پلاسمی و ۶ و ۷) نمونه‌های سیتوپلاسمی پروتئین taFv، تولید شده در Escherichia coli BL21 حامل وکتور pET32a نو ترکیب. سایر خانه‌ها عصاره‌ی سیتوپلاسمی یا پری‌پلاسمی سویه‌های E.coli JM 109 و E.coli Origami حامل وکتور pET32a نو ترکیب هستند (که با Dot blot به روش TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)، اثر حضور پروتئین در آن‌ها مشاهده نشد.



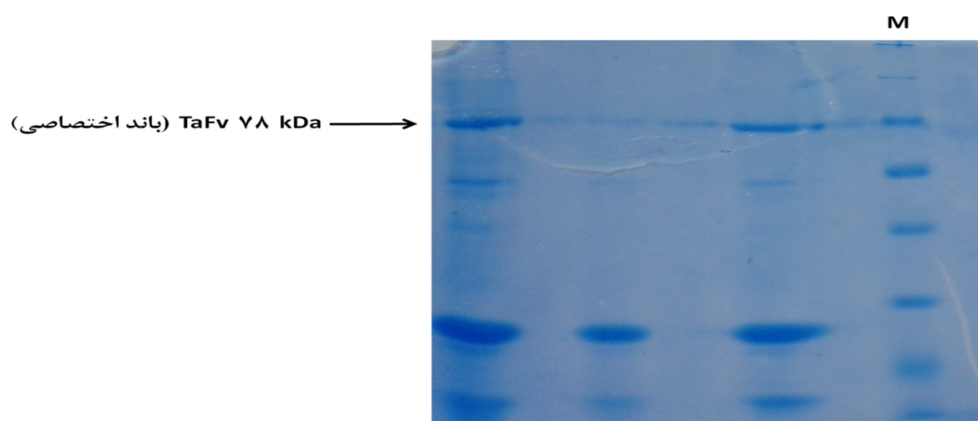
شکل ۲. نتیجه‌ی واکنش Polymerase chain reaction (PCR) قطعه‌ی taFv موجود در pET32a، نشانگر ۱ kb، چاهک‌های شماره‌ی ۱، ۲، ۵، ۶ فقط در دمای Annealing تفاوت دارند. چاهک شماره‌ی ۳، شاهد منفی. قطعه‌ی ۲۳۳۷ bp، taFv تکثیر شده در pET32a نو ترکیب و قطعه‌ی ۷۱۲ bp، pET32a تکثیر شده‌ی بدون قطعه، توسط پرایمرهای T7 را نشان می‌دهد.



شکل ۴. نمای Western blot با آنتی‌بادی Anti His- HRP، باند ۷۸ kDa taFv مشاهده می‌شود.



شکل ۵. تصویر SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) قبل از خالص‌سازی (M) نشانگر رنگی پروتئین. شماره‌های ۱ و ۲) عصاره‌ی پری‌پلاسمی و ۳) عصاره‌ی سیتوپلاسمی *E. coli* BL21 (Escherichia coli) حاوی وکتور pET32a نوترکیب. باند 78 kDa taFv مشاهده می‌شود.



شکل ۶. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) پس از خالص‌سازی. (M) نشانگر باند 78 kDa مربوط به taFv عبور داده شده از ستون نیکل است.

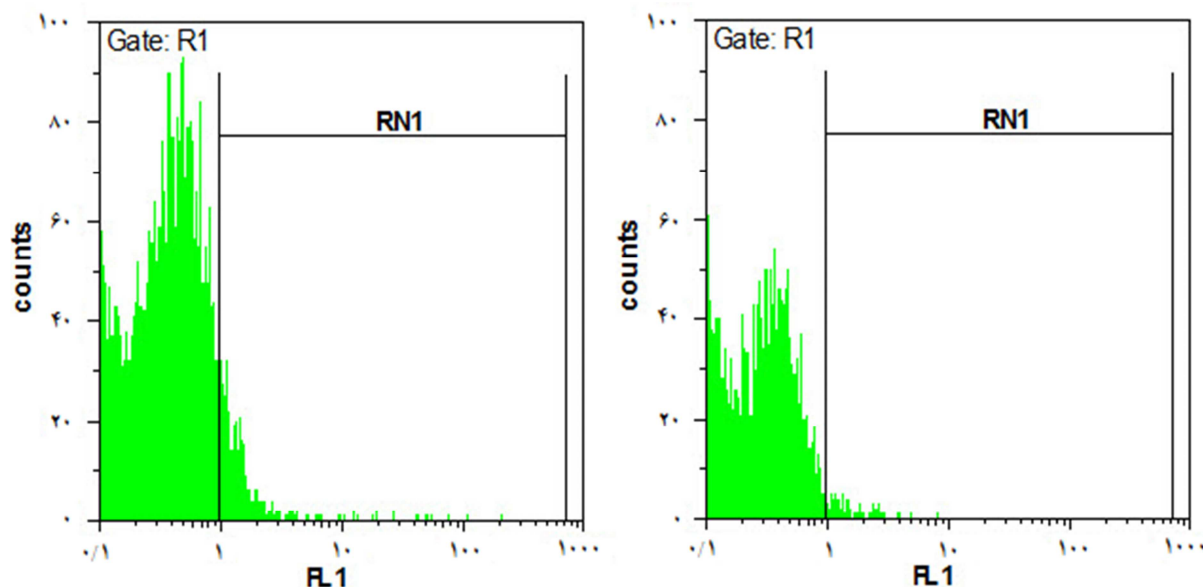
قادر به اتصال به ۲۷/۶۸ درصد از لنفوسیت‌ها نشان داده شد (شکل‌های ۷، ۸ و ۹).

در SDS-PAGE پس از خالص‌سازی باند 78 kDa مربوط به taFv قابل مشاهده است (شکل ۶).

نتایج ELISA، سویه‌ی *E. coli* BL21، محیط کشت SB سوربیتول‌دار، دمای 18 °C و غلظت IPTG 0.5 mM را بهترین شرایط برای تولید taFv نشان داد. غلظت taFv تولیدی با استفاده از آزمایش بردفورد، 27 mg/ml تخمین زده شد. از نظر خاصیت زیستی در بیشترین حالت، taFv قادر به اتصال به 22/75 و آنتی‌بادی تجاری (Anti-human CD4 FITC)

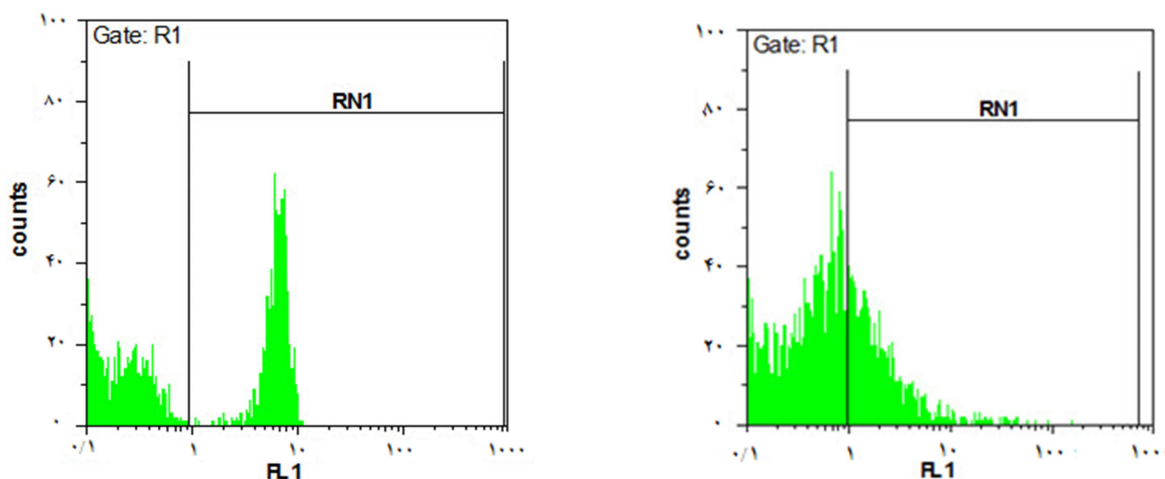
### بحث

لپتین در القای پیشرفت بیماری آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) در موش نقش دارد. موش ob/ob (دچار نقص در ژن لپتین) در برابر ابتلا به EAE از خود مقاومت نشان می‌دهد؛ در حالی که تزریق لپتین به این موش منجر به ایجاد EAE در آن می‌شود.



شکل ۷. نمودار فلوسایتومتری نمونه‌های شاهد منفی: شاهد ایزوتایپ و شاهد FITC

(Fluorescein isothiocyanate) (به ترتیب از راست به چپ). ۶ درصد و ۱/۵۳ درصد از سلول‌ها فلورسنت نشان می‌دهند.



شکل ۹. نمودار فلوسایتومتری شاهد مثبت. ۲۷/۶۸ درصد از

سلول‌ها فلورسنت نشان می‌دهند.

شکل ۸. نمودار فلوسایتومتری نمونه‌ی اصلی. ۲۲/۷۵ درصد از

سلول‌ها فلورسنت نشان می‌دهند (در ناحیه‌ی RN1 هستند).

ممانعت از عمل لپتین بر سلول‌ها، تا حد زیادی می‌توان بیماری‌های خودایمن را مهار کرد، اما آنتی‌بادی علیه لپتین یا گیرنده‌اش عواقب زیادی را به دنبال خواهد داشت؛ چرا که لپتین یک هورمون چند منظوره است و علایم‌دهی گیرنده‌ی لپتین، نقش اساسی در رگ‌زایی، تومورزایی، میزان انسولین خون

به طور کلی، لپتین باعث افزایش واسطه‌های ایمنی سلولی و تمایز لنفوسیت  $TCD4^+$  به سمت  $Th1$  می‌شود. طبیعی است که این اثرات باعث گردد تا لپتین در بعضی از بیماری‌های خودایمن به عنوان یک عامل مستعد کننده‌ی بیماری عمل کند. در نتیجه، با ایجاد آنتاگونیستی در فرم آنتی‌بادی به منظور

برده شد که از طریق تعویض وکتور، یعنی قبل از انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی، بیان قابل توجهی نسبت به قبل حاصل شد.

در مطالعه‌ی Yang و همکاران نیز برای تولید کتابخانه‌ی scFv، لایگیشن کارا، ترانسفورماسیون و دست‌ورزی ژنتیکی آسان TNF-scFv، از وکتور فاژمید pCANTAB 5E و برای بیان از وکتور pBV220 در میزبان E. coli BL21 استفاده شد که باعث افزایش چشمگیر بیان از ۰/۱۵ mg/ml در وکتور فاژمید pCANTAB 5E به ۰/۴۵ mg/ml در وکتور pBV220 شد. افزایش قابل ملاحظه در بیان به پروموتور قوی آن نسبت داده می‌شود که چندین بار کاراتر از پروموتور lac در وکتور فاژمید pCANTAB 5E و pAB1 می‌باشد (۲۰).

در این مطالعه، با وجود این که با به کارگیری سویه‌ی E. coli BL21 و وکتور pET32a (همراه با قطعه‌ی pel B که در آن انتقال داده شد)، به آسانی و در مدت زمان کم، سطح به نسبت خوبی از پروتئین به صورت ترشحي بیان شد، اما با وجود کمتر بودن خاصیت زیستی taFv تولیدی در مقایسه با آنتی‌بادی تجاری تولید شده در سلول هیبریدوما، تولید در باکتری به منظور اهداف درمانی، مستلزم بررسی‌های بیشتر است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد لیلا ممجدی در دانشگاه اصفهان می‌باشد.

و دیابت نوع II، تشکیل استخوان، فشار خون، بلوغ جنسی و باروری بازی می‌کند (۱۹-۱۸).

برای این که اثرات لپتین را فقط در سیستم ایمنی تعدیل کنیم، باید آن را به نحوی فقط به سمت سلول‌های T سوق دهیم و taFv با ویژگی دوگانه، علیه گیرنده‌ی تمایزی سلول‌های T و CD4، و علیه گیرنده‌ی لپتین ابزار مناسبی برای این هدف است.

مطالعات زیادی کارا بودن taFv/scFv را به عنوان ابزار تشخیص و درمان، به علت پایین‌تر بودن ایمونوژنیسیته و نفوذ بهتر در بافت، نشان داده است اما فقدان سیستم کارا برای تولید در حجم زیاد، بزرگ‌ترین مانع برای تحقق نوید آنتی‌بادی درمانی در طیف وسیعی از بیماری‌های انسان می‌باشد (۲۰).

سیستم‌های متنوعی برای بیان و تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب از جمله سیستم‌های باکتریایی، سلول‌های مخمر، گیاهان، سلول‌های حشرات و سلول‌های پستانداران وجود دارد. در این تحقیق، از سیستم باکتریایی E. coli استفاده گردید. دلایل استفاده از این سیستم شامل دست‌ورزی آسان ژنتیکی، ترانسفورماسیون راحت، رشد سریع و عدم نیاز به محیط‌های کشت پیچیده می‌باشد (۲۱).

اگر چه برخی از سیستم‌ها ممکن است میزان بالاتری از برخی آنتی‌بادی‌ها را تولید نمایند، اما باکتری‌ها برای تولید بسیار سریع آنتی‌بادی‌ها و خالص‌سازی آن‌ها بی‌رقیب می‌باشند (۲۲-۲۳).

در این مطالعه نیز با هدف دستیابی به بیان مناسب، از سیستم باکتریایی و وکتور pET32a بهره

### References

- Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 1997; 387(6629): 206-9.



2. Babaei A, Zarkesh-Esfahani SH, Bahrami E, Ross RJ. Restricted leptin antagonism as a therapeutic approach to treatment of autoimmune diseases. *Hormones (Athens)* 2011; 10(1): 16-26.
3. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav* 2004; 81(2): 223-41.
4. Haghjooy Javanmard Sh, Khorshidi Behzadi M, Amjadi F, Khazaei M, Zarkesh Esfahani H. Leptin enhances melanoma tumor growth by increasing endothelial progenitor cells. *J Isfahan Med Sch* 2012; 29(170): 2653-61. [In Persian].
5. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395(6704): 763-70.
6. Massaer M, Mazzu P, Haumont M, Magi M, Daminet V, Bollen A, et al. High-level expression in mammalian cells of recombinant house dust mite allergen ProDer p 1 with optimized codon usage. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125(1): 32-43.
7. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004; 50(9): 1511-25.
8. Fleet JC. Leptin and bone: does the brain control bone biology? *Nutr Rev* 2000; 58(7): 209-11.
9. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(5): 2367-72.
10. Chandra RK. Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob mice. *Am J Clin Nutr* 1980; 33(1): 13-6.
11. Sanna V, Di GA, La CA, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, et al. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest* 2003; 111(2): 241-50.
12. Li C, Friedman JM. Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(17): 9677-82.
13. Carmen S, Jermutus L. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2002; 1(2): 189-203.
14. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(16): 5879-83.
15. Campbell AM. Monoclonal antibody and immunosensor technology. The production and application of rodent and human monoclonal antibodies. Philadelphia, PA: Elsevier; 1991.
16. Babaei A. Production and manipulation of a recombinant bispecific antibody which binds simultaneously to leptin receptor and one of the T lymphocytes CD markers in order to modulate the immune response [PhD Thesis]. Isfahan, Iran: University of Isfahan; 2010.
17. Zarkesh-Esfahani SH, Etamadifar Z. The principle of flow cytometry and its application in biological sciences. 1<sup>st</sup> ed. Isfahan, Iran: Isfahan University Publications; 2010. p. 179. [In Persian].
18. Matarese G, Di GA, Sanna V, Lord GM, Howard JK, Di TA, et al. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001; 166(10): 5909-16.
19. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 2001; 75(22): 10892-905.
20. Yang T, Yang L, Chai W, Li R, Xie J, Niu B. A strategy for high-level expression of a single-chain variable fragment against TNFalpha by subcloning antibody variable regions from the phage display vector pCANTAB 5E into pBV220. *Protein Expr Purif* 2011; 76(1): 109-14.
21. Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24(4): 501-19.
22. Humphreys DP, Sehdev M, Chapman AP, Ganesh R, Smith BJ, King LM, et al. High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence. *Protein Expr Purif* 2000; 20(2): 252-64.
23. Jurado P, Ritz D, Beckwith J, de L, V, Fernandez LA. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 2002; 320(1): 1-10.

## Optimization of Production and Characterization of a Tandem Single Chain Fragment Variable (taFv) against Human Leptin Receptor and Anti-Human CD4

Leila Momajadi MSc<sup>1</sup>, Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani PhD<sup>2</sup>, Mohammad Rabbani PhD<sup>2</sup>, Rahman Emamzadeh PhD<sup>3</sup>, Forouzan Safari<sup>1</sup>, Arash Babaei PhD<sup>4</sup>

### Original Article

### Abstract

**Background:** Leptin deficiency or dysfunction in leptin receptor (ObR) signaling may tend to resistance to autoimmune diseases. On the other hand, leptin receptors exist on many cells and therefore blocking all of them will probably result in unfavorable effects. Targeted ObR blocking on specific immune cells with a leptin antagonist such as taFv (Tandem single chain fragment variable or Tandem scFv) may be advantageous for patients with autoimmune diseases. This project aimed to optimize the condition for large scale production of such molecule and to test its effect.

**Methods:** The cloned taFv gene was sub-cloned from pAB1 to pET32a vector. The taFv fragment existence in pET32a vector was confirmed via polymerase chain reaction (PCR) method using T7 primers. Dot blotting was recruited to detect protein expression. Optimization experiments were carried out and assayed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Finally, the functional activity was evaluated via flow cytometry.

**Findings:** The result of PCR confirmed integration of taFv 2300 bp gene fragment in pET32a vector. Dot blotting confirmed taFv higher expression in pET32a vector compared to previous vector. It was found that media containing sorbitol, Escherichia coli BL21 strain, IPTG 0.05 mM and 18° C temperatures were resulted in higher production of protein levels. Based on flow cytometry, taFv was able to attach to 20% of lymphocytes.

**Conclusion:** pET32a vector with pel B fragment is suitable for secretory overexpression. Production of taFv could be enhanced via optimizing media and culture conditions.

**Keywords:** Leptin, Autoimmune disease, Optimization, Bispecific antibody

**Citation:** Momajadi L, Zarkesh-Esfahani SH, Rabbani M, Emamzadeh R, Safari F, Babaei A. **Optimization of Production and Characterization of a taFv against Human Leptin Receptor and Anti Human CD4.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(355): 1740-51

1- Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, University of Malayer, Malayer, Iran

**Corresponding Author:** Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani PhD, Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

## بررسی مقایسه‌ای تأثیر تجویز داروهای ممانتین و پیراستام بر شدت آفازی متعاقب سگته‌ی مغزی

دکتر فریبرز خوروش<sup>۱</sup>، دکتر مجید قاسمی<sup>۲</sup>، مرضیه نادری<sup>۳</sup>، امید میرمسیب<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** آفازی، یک اختلال اکتسابی زبان به علت ضایعات مغزی است و اغلب در اثر آسیب‌های مغزی در نیمکره‌ی چپ مغز رخ می‌دهد. آفازی، علایمی از قبیل اختلال در تکلم، ادراک شنیداری و ... به همراه دارد که می‌تواند طیف وسیعی از خفیف تا شدید را شامل شود.

**روش‌ها:** مطالعه‌ی حاضر یک کارآزمایی بالینی دو سو کور تصادفی شده بود. جمعیت مورد مطالعه شامل ۷۰ نفر بیماران دچار سگته‌ی مغزی بودند. قبل از آغاز مداخله، با استفاده از پرسش‌نامه، خصوصیات دموگرافیک و اطلاعات مربوط به بیماری بررسی و ثبت گردید. سپس، بیماران به روش تخصیص تصادفی در دو گروه ۳۵ نفره توزیع شدند. گروه اول، قرص پیراستام و گروه دوم قرص ممانتین دریافت کردند.

**یافته‌ها:** ۷۰ بیمار مبتلا به آفازی (۳۵ بیمار در گروه ممانتین و ۳۵ بیمار در گروه پیراستام) مطالعه را تا پایان ادامه دادند. در گروه ممانتین، میانگین سن برابر  $11/8 \pm 61/6$  (در محدوده‌ی سنی ۸۲-۳۸ سال) و در گروه پیراستام، میانگین سن مساوی  $11/8 \pm 62/7$  (در محدوده‌ی سنی ۸۳-۳۷ سال) بود. آزمون ANCOVA نشان داد که پس از مداخله، فقط در حیطه‌ی روانی گفتار، بین دو گروه اختلاف معنی‌دار وجود نداشت، اما در بقیه‌ی حیطه‌ها، میانگین امتیاز در گروه ممانتین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه پیراستام بود.

**نتیجه‌گیری:** اگر چه قرص ممانتین آثار بسیار خوبی در بهبود عوارض آفازی دارد، اما امروزه کمتر توسط پزشکان تجویز می‌گردد. از این رو، تجویز ممانتین برای بیماران به عنوان یک داروی پربازده و ایمن، پیشنهاد می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** ممانتین، پیراستام، آفازی

**ارجاع:** خوروش فریبرز، قاسمی مجید، نادری مرضیه، میرمسیب امید. بررسی مقایسه‌ای تأثیر تجویز داروهای ممانتین و پیراستام بر شدت آفازی متعاقب سگته‌ی مغزی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۵): ۱۷۵۷-۱۷۵۲

مغزی، بیماری‌های دژنراتیو و ... را نام برد که از این بین، سگته‌ی مغزی شایع‌ترین عامل آفازی محسوب می‌شود. سالیانه از هر ۱۰۰۰۰۰ بیمار مبتلا به اولین سگته‌ی مغزی، ۴۲۰ نفر دچار آفازی می‌شوند. آفازی علایمی از قبیل اختلال در تکلم، ادراک شنیداری،

### مقدمه

آفازی، یک اختلال اکتسابی زبان به علت ضایعات مغزی است و اغلب در اثر آسیب‌های مغزی در نیمکره‌ی چپ مغز رخ می‌دهد. علل مختلفی عامل آفازی می‌باشند، از جمله‌ی آن‌ها می‌توان سگته‌ی

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه نورولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه نورولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۴- دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه نورولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: omid.mirmosayyeb@gmail.com

نویسنده‌ی مسؤول: امید میرمسیب

استروک از نوع ایسکمیک، فارسی زبان بودن، عدم ابتلا به صرع و نارسایی کلیه، فقدان سابقه‌ی جراحی مغزی و اختلالات روان‌شناختی، آسیب به سر و خون‌ریزی‌های مغزی و سایر انواع سکت‌های مغزی، عدم مصرف داروهای دوپامینرژیک و کواینرژیک و ابتلا به ایسکمی میوکارد به طور همزمان بودند. همچنین، بیماران بدحال، بیمارانی که به مصرف ممانتین حساسیت داشتند و در مصرف دارو همکاری لازم را نداشتند، از مطالعه خارج گردیدند.

قبل از آغاز مداخله، پرسش‌نامه‌ی شامل خصوصیات دموگرافیک و اطلاعات مربوط به بیماری بررسی و ثبت گردید. تمام بیماران قبل از شروع مداخله توسط گفتار درمان‌گر با استفاده از پرسش‌نامه‌ی P-WAB (Persian-Western Aphasia Battery) که توسط نیلی‌پور و همکاران از نظر روایی و پایایی مورد تأیید قرار گرفته بود، ارزیابی شدند. طبق این پرسش‌نامه، تمامی مهارت‌های ادراکی، بیان شفاهی، تکرار، نامیدن، خواندن و نوشتن بررسی می‌شود (۳).

سپس، بیماران به روش تخصیص تصادفی در دو گروه ۳۵ نفره توزیع شدند. گروه اول قرص ممانتین (سبحان دارو، ایران) ۱۰ میلی‌گرمی روزی ۲ عدد و گروه دوم قرص پیراستام (البرز دارو، ایران) ۸۰۰ میلی‌گرمی روزی یک عدد به مدت ۱۲ هفته دریافت نمودند.

در پایان هفته‌ی دوازدهم، بار دیگر شدت علائم آفازی از طریق تکمیل پرسش‌نامه‌ی P-WAB در دو گروه ارزیابی و مقایسه شد. اطلاعات و داده‌های جمع‌آوری شده در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, SPSS Inc., Chicago, IL) ثبت شد و آنالیزهای مورد نیاز صورت گرفت.

نامیدن، تکرار کلامی، خواندن و نوشتن را به همراه دارد که می‌تواند طیف وسیعی از خفیف تا شدید را شامل شود (۱).

روش‌های درمانی مورد استفاده برای آفازی شامل درمان‌های زبانی، ارتباطی، کامپیوتری و دارویی و درمان‌های تحریکی مغز می‌باشد. داروهای مورد استفاده برای درمان آفازی شامل پیراستام، دونپزیل، ممانتین، بروموکرپیتین و ... می‌باشند. مطالعات کارآزمایی بالینی نشان داده که پیراستام جهت درمان سریع آفازی مطلوب بوده است. همچنین، آثار به نسبت خوبی از تجویز ممانتین بر روی توانایی‌های گفتاری بیماران مشاهده شده است (۲). به دلیل ناتوانی مستمر بیماران مبتلا به آفازی از یک سو و کمبود مطالعات بالینی جهت بررسی سودمندی داروهای مؤثر بر آن از سوی دیگر، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر مصرف داروهای پیراستام و ممانتین بر شدت عوارض آفازی انجام گردید.

## روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، یک کارآزمایی بالینی دو سو کور تصادفی شده بود. جمعیت مورد مطالعه شامل ۷۰ نفر بیماران دچار سکت‌های مغزی بود که متعاقب آن مبتلا به آفازی شده بودند و کمتر از ۱ ماه از سکت‌های آنها گذشته بود. مطالعه‌ی حاضر در بازه‌ی زمانی اسفند سال ۱۳۹۳ تا خرداد سال ۱۳۹۴ در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان انجام گردید.

مقرر شد بیماران که تشخیص قطعی استروک با استفاده از معاینات بالینی و یافته‌های رادیولوژیک برای آنان تأیید شود، وارد طرح شوند. سایر معیارهای ورود عبارت از بیماران با دست راست غالب،

## یافته‌ها

۷۰ بیمار مبتلا به آفازی (۳۵ بیمار در گروه ممانتین و ۳۵ بیمار در گروه پیراستام) مطالعه را تا پایان ادامه دادند. در گروه ممانتین، میانگین سن  $11/8 \pm 61/6$  (در محدوده‌ی سنی ۸۲-۳۸ سال) و در گروه پیراستام، میانگین سن  $11/8 \pm 62/7$  (در محدوده‌ی سنی ۸۳-۳۷ سال) به دست آمد. آزمون  $\chi^2$  نشان داد که توزیع فراوانی جنسی بین دو گروه اختلاف معنی‌دار نداشت ( $P = 0/810$ ). آزمون Independent t نشان داد که میانگین سن دو گروه با هم تفاوت معنی‌دار نداشت ( $P = 0/680$ ).

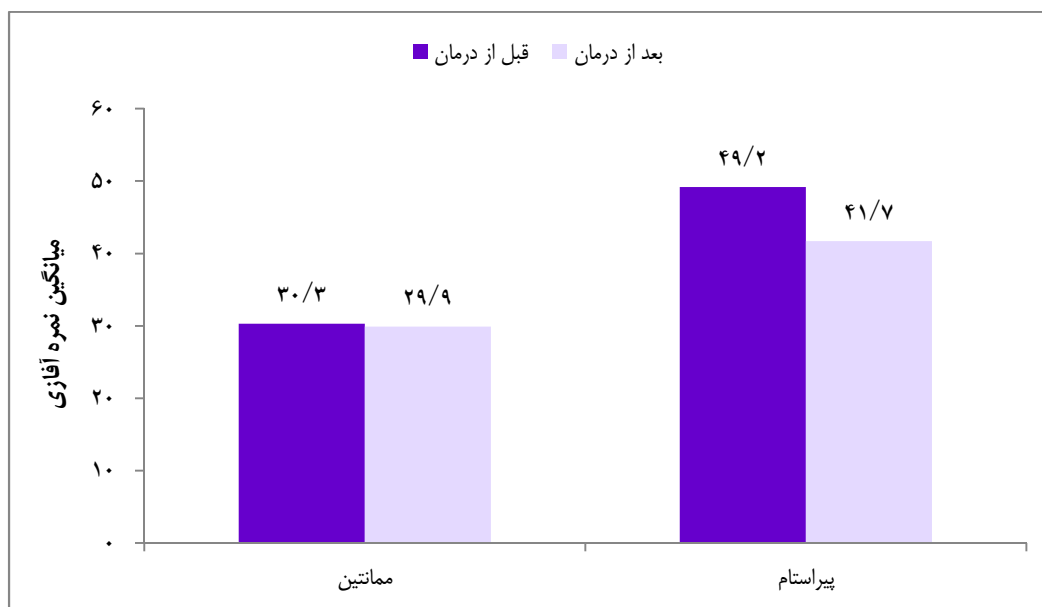
آزمون Independent t نشان داد که میانگین نمره‌ی آفازی قبل از مداخله بین دو گروه اختلاف معنی‌دار نداشت، اما ANCOVA نشان داد که بعد از مداخله، میانگین نمره‌ی آفازی در گروه ممانتین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه پیراستام بود ( $P = 0/002$ ).

آزمون Paired t نشان داد که هم در گروه درمان شده با ممانتین ( $P < 0/001$ ) و هم در گروه پیراستام ( $P < 0/001$ ) میانگین نمره‌ی آفازی بعد از مداخله به طور معنی‌داری بیشتر از قبل از مداخله بود (جدول ۱). آزمون Independent t نشان داد میانگین افزایش نمره‌ی آفازی در گروه ممانتین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه پیراستام است (شکل ۱).

آزمون Independent t نشان داد که میانگین تغییرات نمره‌ی آفازی نه در گروه ممانتین و نه در گروه پیراستام بین خانم‌ها و آقایان تفاوت معنی‌دار نداشت ( $P = 0/770$ ). بنا بر این، بین جنس بیماران و تغییر در نمره‌ی آفازی رابطه‌ای دیده نشد. علاوه بر این، ضریب همبستگی Pearson نشان داد که نه در گروه ممانتین ( $P = 0/310$  و  $r = 0/180$ ) و نه در گروه پیراستام ( $P = 0/240$  و  $r = -0/200$ ) بین سن و تغییر نمره‌ی آفازی رابطه‌ی معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۱. میانگین نمره‌ی آفازی قبل و بعد از مداخله در دو گروه دریافت‌کننده‌ی ممانتین و پیراستام

متغیر	زمان	گروه ممانتین	گروه پیراستام	مقدار $P_1$	مقدار $P_2$
کیفیت محتوای گفتار	قبل	$1/3 \pm 0/2$	$1/4 \pm 0/3$	۰/۶۳۰	-
	بعد	$3/4 \pm 0/4$	$3/2 \pm 0/4$	۰/۱۳۰	۰/۰۳۰
میزان روانی گفتار	قبل	$4/9 \pm 0/7$	$5/1 \pm 0/7$	۰/۸۴۰	-
	بعد	$5/9 \pm 0/7$	$5/8 \pm 0/7$	۰/۹۵۰	۰/۲۴۰
درک شنیداری	قبل	$5/4 \pm 0/6$	$4/3 \pm 0/6$	۰/۸۷۰	-
	بعد	$6/4 \pm 0/6$	$5/7 \pm 0/6$	۰/۴۳۰	۰/۰۳۰
درک دستورات پیوسته	قبل	$3/9 \pm 0/6$	$3/8 \pm 0/5$	۰/۹۲۰	-
	بعد	$6/5 \pm 0/6$	$5/2 \pm 0/6$	۰/۱۴۰	۰/۰۰۱
توانایی تکرار کردن	قبل	$1/8 \pm 0/4$	$1/6 \pm 0/3$	۰/۷۶۰	-
	بعد	$3/6 \pm 0/5$	$2/8 \pm 0/4$	۰/۱۲۰	۰/۰۳۰
توانایی نامیدن	قبل	$1/9 \pm 0/3$	$1/6 \pm 0/3$	۰/۵۶۰	-
	بعد	$3/6 \pm 0/4$	$2/5 \pm 0/3$	۰/۰۳۰	۰/۰۱۰



شکل ۱. میانگین نمره‌ی آفازی قبل و بعد از مداخله در دو گروه دریافت‌کننده‌ی ممانتین و پیراستام

جدول ۲. میانگین امتیاز حیطه‌های مختلف آفازی قبل و بعد از مداخله در دو گروه

مقدار P	گروه پیراستام	گروه ممانتین	
۰/۸۹۹	۲۹/۹ ± ۱۴/۹	۳۰/۳ ± ۱۶/۳	قبل از مداخله
۰/۰۰۲	۴۱/۷ ± ۱۸/۹	۴۹/۲ ± ۲۱/۲	بعد از مداخله
-	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	مقدار P

اوقات بیمار را دچار فراموشی در برابر شخصیت خود می‌کند. سن، جنس، اتیولوژی، نوع استروک، نوع آفازی و اندازه و محل ضایعه‌ی مغزی، عوامل خطر مهمی برای پیدایش عواقب بعدی استروک هستند. در طرح حاضر، تمامی بیمارانی که دچار مشکلات فراموشی و دمانس بودند، از طرح خارج شدند و اثر دو داروی ممانتین و پیراستام فقط بر روی اختلالات گفتاری بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت.

این مطالعه نشان داد که مصرف سه ماهه‌ی هر یک از داروهای ممانتین و پیراستام، باعث بهبود چشم‌گیری در تمامی مهارت‌های بیماران از قبیل محتوای گفتار، روانی گفتار، پیوستگی گفتار، درک شنیداری، درک دستورهای پیوسته، نامیدن و تکرار

طبق آزمون Independent t، بین حیطه‌های مورد بررسی، فقط میانگین نمره‌ی آفازی پس از مداخله در گروه ممانتین به طور معنی‌دار بیشتر از گروه پیراستام بود، اما ANCOVA نشان داد که پس از مداخله فقط در حیطه‌ی روانی گفتار، بین دو گروه اختلاف معنی‌دار وجود نداشت، اما در بقیه‌ی حیطه‌ها، میانگین امتیاز در گروه ممانتین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه پیراستام بود (جدول ۲).

### بحث

آفازی، توانایی عملکردی بیمارانی را که سابقه‌ی سکته‌ی مغزی داشته‌اند، کاهش می‌دهد. این اختلال، در اصل از همی‌پارزی، ناتوان‌کننده‌تر است و بعضی

مطالعات قبلی نتایج بسیار خوبی از مصرف ممانتین در بیماران آفازی مشاهده شد (۷). همچنین، همانند مطالعات قبلی، عوارض جانبی خاصی در هیچ یک از گروه‌های مورد مطالعه یافت نشد (۸).

اگر چه قرص ممانتین آثار بسیار خوبی در بهبود عوارض آفازی دارد، اما امروزه کمتر توسط پزشکان تجویز می‌گردد. از این رو، تجویز ممانتین برای بیماران به عنوان یک داروی پربازده و ایمن، پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای مرضیه نادری به شماره‌ی طرح مصوب ۳۹۴۱۷۸ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد که از مسئولین مربوط سپاسگزاری می‌گردد.

کردن می‌شود. این تأثیر مثبت در گروه مصرف کننده‌ی ممانتین بیشتر از گروه مصرف کننده‌ی پیراستام بود.

پیراستام به عنوان یک مشتق گاما آمینو بوتریک اسید، از طریق آزاد کردن استیل کولین، اثرات کولینرژیک مستقیم دارد، سیالیت غشای نورون را می‌افزاید و با افزایش سوخت و ساز سلولی، از هیپوکسی نورون‌ها جلوگیری می‌نماید (۴). در مطالعات قبلی نیز اثر مثبت پیراستام بر آفازی نشان داده شده است (۵).

در مطالعه‌ی حاضر دیده شد که اثربخشی ممانتین به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از پیراستام بود. ممانتین دارای فعالیت گلوتاماترژیک است، نه تنها آثار حفاظتی از نورون دارد، بلکه منجر به تسهیل و افزایش تبادلات سیناپسی نیز می‌گردد (۶). در

### References

1. El Hachioui H, Sandt-Koenderman MW, Dippel DW, Koudstaal PJ, Visch-Brink EG. The ScreeLing: occurrence of linguistic deficits in acute aphasia post-stroke. *J Rehabil Med* 2012; 44(5): 429-35.
2. Berthier ML, Pulvermuller F, Davila G, Casares NG, Gutierrez A. Drug therapy of post-stroke aphasia: a review of current evidence. *Neuropsychol Rev* 2011; 21(3): 302-17.
3. Nilipour R, Pourshahbaz A, Ghoreyshi ZS. Reliability and validity of bedside version of Persian WAB (P-WAB-1). *Basic Clin Neurosci* 2014; 5(4): 253-8.
4. Navarro SA, Serafim KG, Mizokami SS, Hohmann MS, Casagrande R, Verri WA, Jr. Analgesic activity of piracetam: effect on cytokine production and oxidative stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2013; 105: 183-92.
5. Gungor L, Terzi M, Onar MK. Does long term use of piracetam improve speech disturbances due to ischemic cerebrovascular diseases? *Brain Lang* 2011; 117(1): 23-7.
6. Lam S, Smith C, Gomolin IH. Memantine standard tablet and extended-release dosing considerations: a pharmacokinetic analysis. *J Am Geriatr Soc* 2015; 63(2): 383-4.
7. Barbancho MA, Berthier ML, Navas-Sanchez P, Davila G, Green-Heredia C, Garcia-Alberca JM, et al. Bilateral brain reorganization with memantine and constraint-induced aphasia therapy in chronic post-stroke aphasia: An ERP study. *Brain Lang* 2015; 145-146: 1-10.
8. Stinton C, McKeith I, Taylor JP, Lafortune L, Mioshi E, Mak E, et al. Pharmacological Management of Lewy Body Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Psychiatry* 2015; 172(8): 731-42.

## A Comparative Study of the Prescription of Memantine and Piracetam in Poststroke Aphasia

Fariborz Khorvash MD<sup>1</sup>, Majid Ghasemi MD, Marziyeh Naderi<sup>3</sup>, Omid Mirmosayyeb<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Aphasia is an acquired linguistic disease caused by brain injuries mostly in the left hemisphere. The symptoms can contain a vast spectrum of clinical manifestations.

**Methods:** This double-blind randomized clinical trial study observed 70 patients with stroke. Patients' characteristics and their demographic information registered prior to the intervention. Then, they were divided in two equal groups randomly; one group received piracetam and the other got memantine.

**Findings:** The mean age was  $61.6 \pm 11.8$  and  $62.7 \pm 11.8$  years in memantine and piracetam groups, respectively. Covariance analysis demonstrated more significant improvements in memantine group in all aspects of the study except the fluency of speech.

**Conclusion:** While memantine improve lots of symptoms of aphasia, today it is less considered by physicians. However, we recommend its prescription in patients with aphasia as a safe and efficient drug.

**Keywords:** Memantine, Piracetam, Aphasia

**Citation:** Khorvash F, Ghasemi M, Naderi M, Mirmosayyeb O. **A Comparative Study of the Prescription of Memantine and Piracetam in Poststroke Aphasia.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(355): 1752-7

1- Associate Professor, Isfahan Neuroscience Research Center AND Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Isfahan Neuroscience Research Center AND Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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

4- Student of Medicine, Isfahan Neurosciences Research Center AND Department of Neurology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Omid Mirmosayyeb, Email: [omid.mirmosayyeb@gmail.com](mailto:omid.mirmosayyeb@gmail.com)



## تأثیر محدودیت غذایی دراز مدت بر آپوپتوز میوکارد

دکتر افشار جعفری<sup>۱</sup>، حسن پوررضی<sup>۲</sup>، دکتر سعید نیکوخصلت<sup>۱</sup>، دکتر بهزاد برادران<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** محدودیت غذایی یا کالریک، یکی از مداخلات کاربردی برای کاهش وزن و افزایش طول عمر می‌باشد. با این حال، ابهاماتی در رابطه با فرایندهای پیام‌رسانی مربوط به تأثیر محدودیت غذایی بر پیر شدگی سلولی و آپوپتوز در بافت‌های پیکری حساس مانند میوکارد وجود دارد. بنا بر این، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر محدودیت غذایی دراز مدت بر برخی از شاخص‌های آپوپتوز در میوکارد موش‌های صحرایی انجام شد.

**روش‌ها:** این مطالعه در قالب یک طرح تجربی دو گروهی (مدل حیوانی) به مدت سه ماه روی ۱۶ سر موش صحرایی نر و بیستار ۱۴۸۴۸ سه ماهه انجام شد. آزمودنی‌ها به شکل تصادفی در دو گروه همگن شاهد (تعداد = ۸، وزن =  $29/61 \pm 385/25$  گرم) و مورد (محدودیت غذایی) (تعداد = ۸، وزن =  $21/01 \pm 331/25$  گرم) جایگزین شدند. آزمودنی‌های شاهد به صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت) دسترسی داشتند (۰ درصد محدودیت غذایی)،  $23 \pm 2/16$  گرم در روز، در حالی که غذای آزمودنی‌های گروه تجربی تا حد ۵۰ درصد گروه شاهد محدود شد (۵۰- درصد محدودیت غذایی)،  $11/5 \pm 1/8$  گرم در روز. پس از سه ماه، قلب آزمودنی‌ها استخراج و ژن‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز ۳ میوکارد به عنوان پروتئین‌های کلیدی در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز با استفاده از روش Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) بررسی شد. داده‌های حاصل با استفاده از آزمون Independent t و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵۰ تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 میوکارد گروه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) به طور غیر معنی‌داری به ترتیب ۲۷/۷ و ۲۷/۹ درصد بیشتر از گروه شاهد بود. در حالی که بیان ژن کاسپاز-۳ و نسبت Bax/Bcl2 میوکارد گروه شاهد به طور غیر معنی‌داری به ترتیب ۳۹/۴ و ۶/۹ درصد بیشتر از گروه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) بود.

**نتیجه‌گیری:** در کل، سه ماه محدودیت غذایی (۵۰- درصد)، آپوپتوز میوکارد را چندان تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. هر چند، این احتمال وجود دارد که محدودیت غذایی، روند آپوپتوز میوکارد را از طریق افزایش Bcl-2 و کاهش کاسپاز ۳، کند نماید.

**واژگان کلیدی:** محدودیت غذایی، میوکارد، آپوپتوز

**ارجاع:** جعفری افشار، پوررضی حسن، نیکوخصلت سعید، برادران بهزاد. تأثیر محدودیت غذایی دراز مدت بر آپوپتوز میوکارد. مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۵): ۱۷۷۰-۱۷۵۸

سراسر دنیا هستند؛ به طوری که پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۰، بیش از ۴۰ درصد مرگ و میرها ناشی از بیماری‌های قلبی-عروقی باشد. عوامل متعددی در

## مقدمه

بیماری‌های قلبی-عروقی همچنان به عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامتی و دلایل مرگ و میر در

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

است. به هر حال، رخدادهای مولکولی آپوپتوز، به طور اساسی به واسطه تعادل بین پروتئین‌های ویژه تنظیمی پیش و ضد آپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین، پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی درگیر می‌شوند.

تحقیقات نشان داده است که پروتئین Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری، می‌تواند منتج به رهائش عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم c از فضای بین غشایی شود. این در حالی است که پروتئین Bcl2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می‌کند و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شود. در این بین، فصل مشترک همه‌ی مسیرهای آپوپتوزی، در نهایت فعال‌سازی کاسپاز ۳ و تجزیه‌ی پروتئین‌های حیاتی سلول است (۵، ۳-۱).

بنا بر این، پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از میوکارد در مقابل آپوپتوز و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن هستند. در این بین، محدودیت غذایی یا کالریک، به عنوان یکی از مهم‌ترین مداخلات کاربردی، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. در دهه‌های اخیر، نتایج برخی از مطالعات اشاره دارد که محدودیت غذایی یا کالریک پایین تا حد متوسط (بدون سوء تغذیه) ممکن است به عنوان یک رویکرد ضد آپوپتوزی عمل کند. Niemann و همکاران گزارش کردند که شش ماه محدودیت کالریک (۴۰- درصد) موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA و بیان پروتئین Bax و افزایش بیان پروتئین Bcl2 در میوکارد موش‌های صحرایی سالخورده می‌شود. آن‌ها معتقد بودند که کاهش فعالیت کمپلکس I میتوکندری

سطح سلولی برای بروز بیماری‌های قلبی-عروقی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به مسیرهای پیام‌رسانی استرس اکسایشی و اختلالات میتوکندریایی، عوامل التهابی-ایمنی و آپوپتوز اشاره کرد. در این بین، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده، یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری قلبی-عروقی به ویژه ناتوانی قلبی است. این فرایند که در تنظیم تعادل بین زایش و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف به ویژه بافت‌های سوماتیک مانند میوکارد نقش اساسی دارد، با فشردگی و تکه تکه کردن کروماتین‌ها و چگال نمودن سیتوپلاسم سلولی کار خود را آغاز می‌نماید و با مچاله شدن هسته و غشاهای سلولی و تولید واکوئل‌های محتوی ذرات آپوپتوتیک خاتمه می‌یابد (۳-۱).

مطالعات موجود حاکی از آن است که میزان اندک آپوپتوز میوکارد (در حدود ۰/۰۰۲-۰/۰۰۱ درصد) ممکن است در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند پرتوافکنی، ایسکمی/خون‌رسانی مجدد، داروهای مختلف، سال‌خوردگی و فشارهای جسمانی (مکانیکی-متابولیکی) تشدید پیدا کند و از این طریق، مقدمات بروز انواع بیماری‌های قلبی-عروقی را فراهم نماید (۲-۱).

این فرایند فیزیولوژیک، اغلب از طریق دو مسیر داخل و خارج سلولی رخ می‌دهد. مسیر خارجی با اتصال لیگاندهای مهم مانند TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) و Fas به گیرنده‌های غشایی القاکننده‌ی مرگ راه‌اندازی می‌شود (۲-۱). در حالی که، مسیر داخلی به عنوان مهم‌ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذ پذیری میتوکندری و رهائش عوامل آپوپتوزی همراه

هر چند بر اساس اطلاعات و دانش ما، تا زمان انجام مطالعه‌ی حاضر، پژوهشی در داخل کشور در این زمینه انجام نشده بود و در سایر مطالعات قبلی نیز بافت میوکارد کمتر در طی محدودیت‌های غذایی یا کالریک طولانی مدت و بالای ۴۰ درصد مورد بررسی قرار گرفته بود که نتایج متناقضی نیز از این مطالعات در دسترس است. به علاوه، هنوز فرایندهای مولکولی و پروتئین‌های درگیر در مسیرهای پیام‌رسانی آپوپتوز به دنبال محدودیت‌های غذایی، به طور دقیق و کامل مشخص نشده بود. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر سه ماه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) بر بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز ۳ در میوکارد موش‌های صحرایی انجام شد.

### روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه در قالب یک طرح تجربی دو گروهی و در دانشگاه تبریز انجام شد. با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه‌ی حاضر، ۱۶ موش صحرایی نر دو ماهه‌ی ویستار ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید شامل دما ( $22 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد)، رطوبت محیط ( $50 \pm 5$  درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طی این دوره، تمامی آزمودنی‌های به صورت آزادانه از غذای استاندارد حیوانی (پلت) و آب استفاده می‌کردند و میزان غذای مصرفی روزانه‌ی آنها به صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت می‌شد.

ترکیب غذای مصرفی عبارت از ۵-۴ درصد

و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا Reactive oxygen species) که همراه با تغییرات عملکرد میتوکندریایی است، مهم‌ترین دلیل افزایش فرایند آپوپتوز در سلول‌های قلبی می‌باشد و احتمال می‌رود، محدودیت غذایی با کاهش تولید ROS قادر به ممانعت از افزایش بی‌رویه‌ی فرایند آپوپتوز در این بافت حیاتی باشد (۶).

این در حالی است که نتایج برخی از مطالعات از این رویکرد حمایت نمی‌کند. در این راستا، نتایج Patel و همکاران حاکی است که یک دوره‌ی محدودیت کالری طولانی مدت ۴۰- درصدی موجب افزایش آپوپتوز در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مبتلا به ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) می‌شود. بر این اساس، محدودیت کالریک طولانی مدت با افزایش فشار اکسایشی و کاهش محتوی Hsp70 سلولی، موجب افزایش پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax و تسریع فرایند آپوپتوز شد (۷).

همچنین، Tejero-Taldo و همکاران اشاره داشتند که اگر محدودیت غذایی با کمبود طولانی مدت برخی از ریز مغذی‌ها مانند منیزیم همراه شود، می‌تواند زمینه‌ی بروز آپوپتوز قلبی را از طریق افزایش پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و فعالیت کاسپاز ۳ فراهم نماید (۸). به هر حال، با توجه به محدودیت‌های غذایی طولانی مدت و اغلب شدیدی که بیشتر افراد برای کاهش وزن یا پیش‌گیری از چاقی مورد استفاده قرار می‌دهند و با توجه به نقش حساس و کلیدی بافت میوکارد در سلامتی و عملکرد، این موضوع یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است که می‌تواند ذهن پژوهشگران و حتی اغلب افراد جامعه را به خود جلب کند.

چربی، حدود ۲۰ درصد پروتئین، ۵۵-۵۰ درصد کربوهیدرات، ۵-۸ درصد فیبر و ۱۰-۱۲ درصد رطوبت و خاکستر بود. موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به دو گروه شاهد ( $n = 8$ ) و محدودیت غذایی ( $n = 8$ ) جایگزین شدند.

**پروتکل رژیم غذایی:** آزمودنی‌های گروه شاهد به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول سه ماه دوره‌ی پژوهش (فصل پاییز) استفاده کردند. در طول این دوره، میزان غذای مصرفی آزمودنی‌های گروه شاهد برای تعیین مقدار غذای گروه محدودیت غذایی، به صورت روزانه و دقیق اندازه‌گیری می‌شد. میانگین غذای مصرفی این آزمودنی‌ها در طول این دوره حدود  $2/16 \pm 23/00$  گرم در روز بود. بدین ترتیب، گروه دارای محدودیت غذایی تنها ۵۰ درصد مقدار غذای مصرفی گروه شامل را دریافت می‌کرد (حدود  $1/8 \pm 11/5$  گرم در روز) که این مقدار نیز به صورت دو وعده‌ای و طی دوره‌ی ۱۲ ساعته‌ی تاریکی به موش‌های دارای محدودیت غذایی داده می‌شد.

**جراحی و استخراج نمونه:** تمامی موش‌های صحرائی پس از اتمام سه ماه دوره‌ی پژوهش، با تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند و پس از آن، بخش اعظم خون (حدود ۵-۴ سی‌سی) از قسمت سینوس چشمی و به وسیله‌ی لوله‌های موئینه جمع‌آوری شد. سپس، موش‌ها بلافاصله توسط متخصصین کارآموده جراحی و قلب آن‌ها استخراج و در مایع فیزیولوژیک انداخته شد. پس از تخلیه‌ی خون قلب و وزن‌کشی آن، بلافاصله دهلیزها از بطن جدا شد و بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها در کرایوتیوب در

نیترژن مایع قرار داده شد و برای بررسی‌های بعدی در دمای  $-70$  درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. استخراج RNA: برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (ThermoK0731، آمریکا) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت بطن چپ در حضور ۱ میلی‌لیتر RNXTM-PLUS (سیناژن، ایران) هم‌وزنه شد و سپس، به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. آن‌گاه، به هر میکروتیوب  $0/2$  میلی‌لیتر کلروفرم افزوده و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد و ۵ دقیقه در دمای  $4$  درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید؛ در ادامه، محلول به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه‌ی سانتی‌گراد و  $13700$  برابر جاذبه (g) سانتریفیوژ شد.

سپس، به دقت و بدون تکان دادن تیوب، بخش رویی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شد و به محلول جدا شده، حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه، در دمای  $-20$  درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از آن، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط  $4$  درجه‌ی سانتی‌گراد و  $13700$  g سانتریفیوژ و مایع رویی بیرون ریخته شد.

آن‌گاه، ۱ میلی‌لیتر اتانول  $80$  درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط  $4$  درجه‌ی سانتی‌گراد و  $13700$  g سانتریفیوژ و مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد.

سپس بار دیگر، در آب تیمار شده با دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC یا Diethylpyrocarbonate)

حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad، آمریکا) بررسی شد. همچنین، RNA تام به روش الکتروفورز روی ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید و مشاهده ی دو بانده مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریپوزومی کنترل شد. RNA استخراج شده برای استفاده ی بعدی در دمای ۷۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد.

ساخت cDNA: با استفاده از کیت RevertAID First Standard cDNA synthesis (Fermentas)™ (کانادا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر انجام شد: ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و توسط DEPC-treated eater به حجم ۹ میکرولیتر رسید. ۱ میکرولیتر (Deoxyribonuclease) به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوط به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه ی سانتی گراد قرار گرفت. تیوب مربوط به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه ی سانتی گراد و ۱۴۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شد؛ پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد.

انجام Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR): برای اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین های Bax، Bcl2 و کاسپاز ۳، از دستگاه Corbett-Rotor gene-6000 (Corbett Research، استرالیا) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی شد و با به کارگیری بایونیر (Bioneer، آلمان) سنتز و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ nM استفاده گردید.

پرایمرها: واکنش ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green I انجام شد. رنگ Syber green I واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته ای متصل می شود و نور فلورسنت ساطع می کند. در جدول ۱، توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش های صحرایی مشخص شده است. به عنوان بلانک، از تیوبی که حاوی همه ی مواد موجود در واکنش به جز cDNA (Complementary DNA) بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوط DEPC water افزوده شد.

ساخت cDNA: با استفاده از کیت RevertAID First Standard cDNA synthesis (Fermentas)™ (کانادا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر انجام شد: ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و توسط DEPC-treated eater به حجم ۹ میکرولیتر رسید. ۱ میکرولیتر (Deoxyribonuclease) به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوط به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه ی سانتی گراد قرار گرفت. تیوب مربوط به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه ی سانتی گراد و ۱۴۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شد؛ پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد.

به تیوب مربوط، ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و ۱ میکرولیتر oligi (dt) Primer یا Random hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه ی سانتی گراد بر روی Dry block، انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر Reaction buffer 5X، ۲ میکرولیتر mix 10mM dNTP (Deoxynucleotide triphosphate) و ۱ میکرولیتر

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

طول محصول (bp)	توالی پرایمر	ژن
۱۳۶	F: 5'TATATGGCCCCAGCATGCGA3' R: 5'GGGCAGGTTTGTGCGACCTCA3'	Bcl2
۱۵۰	F: 5'ATCCAAGACCAGGGTGGCTG3' R: 5'CACAGTCCAAGGCAGTGGGA3'	Bax
۱۱۸	F: 5'GGAGCTTGGAAACGGTACGCT3' R: 5'AGTCCACTGACTTGCTCCCA3'	Caspase3
۱۳۸	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT3' R: 5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC3'	$\beta$ -actin

بودند و منحنی مربوط به این نمونه طبیعی فرض شد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی داری بین گروه شاهد و محدودیت غذایی در رابطه با وزن بدن و قلب مشاهده شد ( $P < 0/010$ )؛ به طوری که گروه شاهد دارای وزن بدنی (۶۶/۷۷ درصد) و قلبی (۵۲/۸۶ درصد) بزرگتری نسبت به گروه محدودیت غذایی بود.

با این حال، زمانی که نسبت وزن قلب به وزن بدن مورد بررسی قرار گرفت، گروه محدودیت غذایی به طور معنی داری ( $P < 0/050$ ) دارای نسبت بزرگتری (وزن قلب/ وزن بدن = ۸/۵ درصد) بود (جدول ۲).

در رابطه با شاخص‌های مربوط به آپوپتوز، نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروه شاهد و مورد در بیان ژن‌های Bcl2، Bax، کاسپاز ۳ و نیز نسبت Bax/Bcl2 وجود ندارد ( $P > 0/050$ ). با این حال، میزان بیان ژن‌های Bcl2 و Bax در گروه مورد نسبت به شاهد، به ترتیب ۲۷/۷ و ۲۷/۹ درصد بیشتر بود (شکل‌های ۱ و ۲). این در حالی است که نسبت Bax/Bcl2 در گروه شاهد، در مقایسه با گروه مورد، ۶/۹ درصد بزرگتر بود (شکل ۳). همچنین، میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه شاهد نسبت به گروه مورد، ۳۹/۳۷ درصد بالاتر بود (شکل ۴).

در پایان، قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا،  $\Delta Ct$  ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوط و  $\beta$ -actin به عنوان مرجع محاسبه شد.

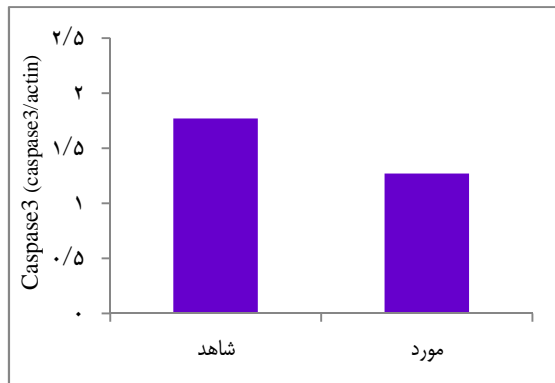
تجزیه و تحلیل آماری: در بخش تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا توزیع توأم و به‌هنگام با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده‌های حاصل، با استفاده از آزمون Independent t برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین دو گروه شاهد و مورد، بررسی شد. تمامی محاسبات آماری در سطح معنی داری ۰/۰۵۰ و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc., Chicago, IL, version 19) انجام گردید.

### یافته‌ها

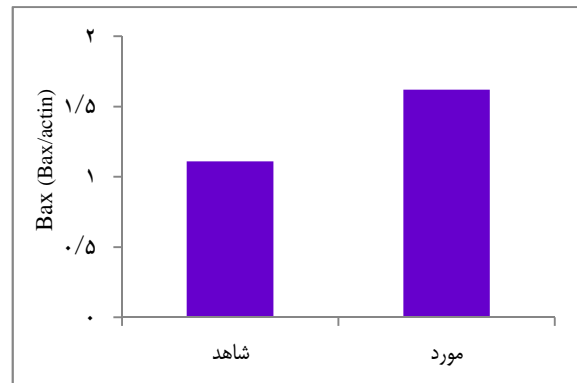
بر اساس نتایج حاصل از آزمون Kolmogorov-Smirnov، اختلاف معنی داری بین نمونه‌ی در دسترس با جامعه‌ی مورد نظر مشاهده نشد؛ بنا بر این، داده‌های جمع‌آوری شده همگن

جدول ۲. مشخصات موش‌های صحرایی در دو گروه شاهد و مورد

متغیر	شاهد میانگین $\pm$ انحراف معیار	مورد میانگین $\pm$ انحراف معیار
وزن بدن (گرم)	۳۸۵/۲۵ $\pm$ ۲۹/۶۰	۲۳۱/۲۵ $\pm$ ۲۱/۰۱
وزن قلب (گرم)	۱/۰۶ $\pm$ ۰/۱۳	۰/۶۹ $\pm$ ۰/۰۸
وزن قلب/وزن بدن (گرم/کیلوگرم)	۲/۷۷ $\pm$ ۰/۲۲	۲/۹۸ $\pm$ ۰/۲۱



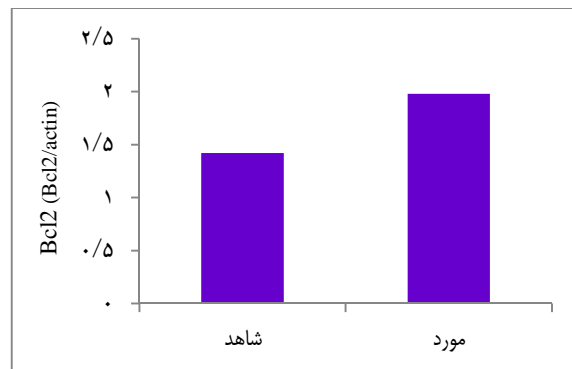
شکل ۴. میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در دو گروه شاهد و مورد



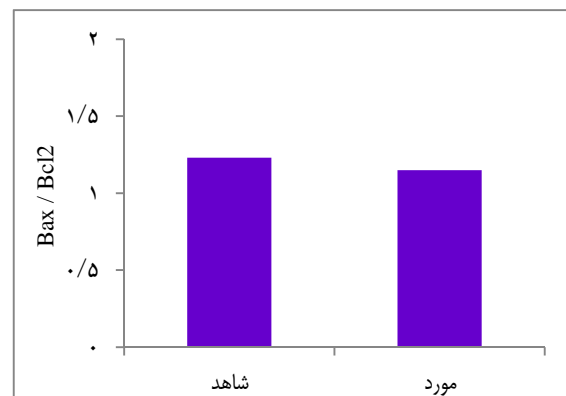
شکل ۱. میزان بیان ژن Bax در دو گروه شاهد و مورد

### بحث

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، سه ماه محدودیت غذایی (۵۰ درصد) موجب کاهش معنی دار وزن بدن و وزن قلب در موش‌های صحرایی نر شد. این موضوع، با توجه به کاهش دریافت مواد غذایی در گروه محدودیت غذایی نسبت به گروه شاهد با دسترسی آزاد به غذا، آن هم برای مدت سه ماه دور از انتظار نبود. چنان که در تمام مطالعات قبلی نیز حتی با دوره‌های محدودیت کوتاه مدت نیز کاهش وزن بدن و قلب مشاهده شده است. با این حال، زمانی که نسبت وزن قلب به وزن بدن مورد بررسی قرار گرفت، گروه مورد به طور معنی داری دارای نسبت بزرگ‌تری بود؛ به طوری که این نسبت در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد، حدود ۹ درصد بزرگ‌تر بود. این موضوع، در برخی از مطالعات قبلی به ویژه در بین موش‌های صحرایی جوان اشاره شده



شکل ۲. میزان بیان ژن Bcl-2 در دو گروه شاهد و مورد



شکل ۳. میزان نسبت Bax/Bcl-2 در دو گروه شاهد و مورد

آپوپتوزی یک دوره‌ی ۶ ماهه محدودیت کالریک ۴۰ درصد، تنها در موش‌های سالخورده مشهود بود و در موش‌های جوان با محدودیت غذایی، تغییرات جزئی در قطعه قطعه شدن DNA میتوکندریایی، بیان پروتئین Bax و Bcl2، رهایش سیتوکروم c و فعالیت کاسپاز ۹ مشاهده شد (۶).

در تأیید نتایج Niemann و همکاران (۶)، Gredilla و همکاران گزارش کردند که محدودیت کالریکی (۴۰- درصد) طولانی مدت (یک سال) موجب کاهش ۴۵ درصدی تولید  $H_2O_2$  میتوکندریایی و کاهش ۳۰ درصدی آسیب اکسایشی DNA میتوکندریایی تنها در میوکارد موش‌های صحرایی سالخورده (۲۴ ماهه) می‌شود و تغییرات معنی‌داری در موش‌های جوان مشاهده نشد (۱۰). به نظر می‌رسد که افزایش سن، یکی از مهم‌ترین عوامل بروز و تشدید آپوپتوز در بافت میوکارد باشد و با پیشرفت سن، میزان مرگ سلول‌های قلبی افزایش یابد (۱۱-۱۲).

یکی از مهم‌ترین فرضیات در این زمینه، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش دفاع ضد اکسایشی و افزایش آسیب‌های میتوکندریایی است (۱۱-۱۴)؛ به طوری که Li و همکاران (۱۵) و نیز Tsujita و همکاران (۱۶) عنوان داشتند که علت افزایش سلول‌های آپوپتوتیک در موش‌های مسن، کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی است که گاهی اوقات دلیل آن تغییر در تحت واحدهای پروتئین‌های P47 Phox و P91 Phox وابسته به NADPH OXIDASE سلول‌های قلبی می‌باشد. به عبارتی، زمانی که احتمال بروز آپوپتوز در این بافت سوماتیک افزایش و تشدید یابد، تأثیرات محدودیت غذایی و کالریک متوسط و بدون سوء تغذیه بر شاخص‌های آپوپتوز میوکارد

است. در این راستا، Niemann و همکاران اشاره داشتند که موش‌های جوان دارای محدودیت کالریک ۴۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد، دارای نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن بزرگ‌تری بودند (۶).

همچنین، Selman و همکاران نشان دادند که دو ماه محدودیت کالریکی ۴۰ درصد موجب افزایش نسبت وزن قلب و عضله‌ی اسکلتی به وزن بدن در مقایسه با گروه شاهد می‌شود (۹). با این وجود، بدون بررسی وضعیت ترکیب بدنی آزمودنی‌ها به ویژه تعیین تغییرات بافت چربی و بافت بدون چربی به دنبال دوره‌های محدودیت غذایی و با در نظر گرفتن آتروفی ایجاد شده در قلب، اظهار نظر در رابطه با افزایش نسبت وزن قلب به بدن و بهبود کارایی سیستم قلبی-عروقی در موش‌های دارای محدودیت غذایی دشوار است.

بر اساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و مورد در بیان ژن‌های Bax، Bcl2، کاسپاز ۳ و نیز نسبت Bax/Bcl2 در میوکارد موش‌های صحرایی وجود ندارد. اگر چه اغلب مطالعات به تأثیرات ضد آپوپتوزی و ضد پیری محدودیت غذایی و کالریک اشاره داشتند، اما در پژوهش حاضر، این اثر به شکل معنی‌داری مشاهده نشد.

آن چه که در این رابطه در مطالعات قبلی مشهود است، استفاده از نمونه‌های حیوانی پیر و سالخورده - اغلب بالای ۱۸ ماه سن - می‌باشد. در حالی که سن تقریبی موش‌های مورد استفاده در این مطالعه در شروع دوره در حدود سه ماه و در پایان دوره‌ی پژوهش شش ماه بود که به عنوان موش صحرایی جوان و بالغ محسوب می‌شوند. در این راستا، Niemann و همکاران دریافتند که اثرات ضد



مشهودتر است.

Kwak در مقاله‌ی مروری خود در رابطه با تأثیرات پیری روی آپوپتوز قلب، عنوان داشت که هنوز ابهامات زیادی در مورد تغییرات وابسته به سن در بیان پروتئین‌های Bax و Bcl2 وجود دارد؛ به طوری که در برخی از مطالعات، بروز و تشدید آپوپتوز بدون تغییرات قابل ملاحظه در بیان پروتئین Bax نیز مشاهده شده است (۲). از این رو، با توجه به این که در پژوهش حاضر با عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین دو گروه، بیان پروتئین Bax به دنبال سه ماه محدودیت غذایی، حدود ۲۸ درصد افزایش یافته است و امکان بررسی سایر شاخص‌های آپوپتوزی مانند سیتوکروم c، AIF (Apoptosis-inducing factor)، Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1)، تکه شدن کروماتینی و ... میسر نبود، بایستی با احتیاط بیشتری در مورد محدودیت غذایی و آپوپتوز قلبی اظهار نظر کرد.

به عبارتی، با افزایش طول دوره‌ی محدودیت غذایی -شش ماه و بیشتر- و در محدودیت‌های شدید و بالای متوسط (بالای ۴۰ درصد)، احتمال تغییرات شاخص‌ها در بافت قلبی که به تغییرات کاهش انرژی بسیار حساس می‌باشد، وجود دارد. در این راستا، Marzetti و همکاران در مقاله‌ای مروری اشاره داشتند که تنها محدودیت کالریک ملایم (۴۰-۸ درصد) با کاهش فشار اکسایشی، عملکرد نامطلوب میتوکندری، التهاب و نیز تعدیل مناسب آپوپتوز می‌تواند موجبات حفاظت از میوکارد را فراهم سازد. محدودیت کالریک این عملکرد حفاظتی را در برابر آپوپتوز از طریق افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl2 و پایداری غشای میتوکندریایی

انجام می‌دهد (۱۷).

از طرفی، اگر چه در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و مورد مشاهده نشد، با این حال نسبت Bax/Bcl2 در گروه شاهد در مقایسه با گروه مورد، ۶/۹ درصد بزرگ‌تر بود. همچنین، میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه شاهد نسبت به گروه مورد، ۳۹/۳۷ درصد بالاتر بود. رخدادهای مولکولی آپوپتوز به طور اساسی به واسطه‌ی تعادل بین پروتئین‌های ویژه‌ی تنظیمی پیش و ضد آپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین، پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی درگیر می‌شوند که افزایش Bcl2 و به دنبال آن کاهش نسبت Bax/Bcl2 یکی از مهم‌ترین عوامل برای جلوگیری از آسیب غشای میتوکندریایی و ممانعت از بروز و تشدید آپوپتوز می‌باشد.

برخی از مطالعات اشاره دارند که محدودیت غذایی از طریق تغییر بیان برخی از ژن‌ها به ویژه ژن‌های تنظیم‌گر متابولیسم اسیدهای چرب و در پی آن، کاهش فشار اکسایشی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، موجب افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl2 می‌شود و از طرفی، با کاهش انتقال پروتئین Bax به سمت غشای میتوکندری و افزایش پایداری غشا، موجبات حمایت از میوکارد را در برابر آپوپتوز فراهم می‌کند (۱۸-۱۹).

همچنین، این فرایند اغلب با کاهش بیان و فعالیت کاسپاز ۳ که یک مرحله‌ی اساسی در بروز آپوپتوز می‌باشد، همراه است. با این حال و بر خلاف نتایج پژوهش حاضر و برخی از مطالعات قبلی، نتایج مطالعه‌ی اخیر Patel و همکاران حاکی از آن است که

افزایش پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و تسریع فرایند آپوپتوز شده است.

از طرفی، James و همکاران بر این باورند که محدودیت غذایی طولانی مدت بدون توجه به سن، می تواند فرایند آپوپتوز را به ویژه در بافت کبدی افزایش دهد. این پژوهشگران، عنوان داشتند که محدودیت غذایی طولانی مدت، موجب کاهش سطوح گردش خون IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) و نیز IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor) می شود (۲۲). به نظر می رسد که این کاهش مستمر و طولانی سطوح گردش خون IGF-1 و تنظیم کاهشی IGF-1R موجب غیر فعال شدن مسیر پیام رسانی PI3K/Akt شده، از این طریق، زمینه برای فعال شدن GSK3 (Glycogen synthase kinase3) و تجزیه هر چه بیشتر  $\beta$ -کاتین فراهم می شود. این کاهش پروتئین  $\beta$ -کاتین و افزایش  $\beta$ -GSK3 ممکن است موجب افزایش بیان و جابه جایی عوامل پیش آپوپتوزی مانند پروتئین های Bax و Bim و تسریع آپوپتوز شود (۲۳-۲۵).

همچنین، افزایش هورمون های استرسی و فعال شدن برخی از سایتوکین ها در پاسخ به فشار متابولیکی حاصل از محدودیت غذایی شدید و طولانی مدت، می تواند زمینه را برای بروز آپوپتوز قلبی فراهم کند. بر اساس گزارش Whelan و همکاران، فعال شدن مسیر Gαq و افزایش بیان آن در بافت میوکارد از طریق تحریک گیرنده های آلفا-آدرنژیک و آنژیوتانسین II، موجب افزایش بیان Nix/Bnip3L - پروتئین شبه BH3- و ایجاد آپوپتوز میوکارد می شود (۲۶).

با این حال، در مطالعه ی حاضر نیز به دلیل

یک دوره محدودیت کالریک طولانی مدت (۴۰- درصد) به دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و التهاب، موجب افزایش آپوپتوز در عضله ی اسکلتی موش های مبتلا به ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) می شود. این پژوهشگران عنوان داشتند مطالعه ی آنها، اولین پژوهشی است که اشاره به زیان آور بودن محدودیت غذایی دارد. بر این اساس، محدودیت کالریک طولانی مدت با افزایش MDA (Methylenedioxyamphetamine) و فشار اکسایشی و کاهش محتوای Hsp70 سلولی، موجب افزایش پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و تسریع فرایند آپوپتوز می شود. با این حال، آنها اشاره داشتند که مکانیسم های مولکولی این فرایند هنوز نامشخص است (۷).

دلیل تناقض نتایج پژوهش Patel و همکاران (۷) با مطالعه ی حاضر، به طور عمده ناشی از مدل حیوانی و بافت مورد استفاده، مدت دوره و مقدار محدودیت می باشد. Patel و همکاران (۷)، برای مطالعه از موش های مبتلا به ALS استفاده کردند. بیماری ALS، یک عارضه ی عصبی است که با تخریب واحدهای حرکتی در مغز و نخاع، سفت شدن عضلات اسکلتی و افزایش فشار اکسایشی همراه است؛ به طوری که دریافت انرژی پایین در این بیماران، می تواند منجر به مرگ نیز شود (۲۱-۲۰).

از طرفی، Patel و همکاران (۷) از یک دوره ی محدودیت کالریک طولانی مدت ۴۰ درصدی استفاده کرده بود. به همین دلیل، این فشار متابولیکی بالا و طولانی مدت در این نوع از گونه ی حیوانی شاید موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش فشار اکسایشی، کاهش محتوای Hsp70 سلولی و نیز

غذایی روند آپوپتوز میوکارد را از طریق افزایش Bcl-2 و کاهش کاسپاز ۳، کند نماید. با این حال، با توجه به طول دوره ی محدودیت غذایی و مقدار آن در پژوهش حاضر و نیز محدودیت های موجود در آن، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه ی تأثیر پذیری شاخص های مربوط به آپوپتوز میوکارد از محدودیت کالریک یا غذایی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می باشد.

### تشریح و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه ی دکترای تخصصی حسن پوررضی، مصوب دانشکده ی تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تبریز می باشد. نویسندگان از جناب آقای دکتر فرزام شیخزاده به خاطر راهنمایی و همکاری صمیمانه، کمال تشکر را دارند. همچنین، از جناب آقای دکتر امیر منفردان مدیر عامل شرکت تخصصی آسان تشخیص آذربایجان قدردانی می گردد.

محدودیت های موجود امکان بررسی جامع و کامل شاخص ها و عوامل تحریک کننده ی آپوپتوز به دنبال محدودیت غذایی وجود نداشت. از این رو، اظهار نظر صحیح در این زمینه و شناسایی دقیق مکانیسم های مولکولی این فرایند، نیازمند بررسی بیشتر و گسترده تر است.

در نهایت، چنین به نظر می رسد که یک محدودیت غذایی (۵۰- درصد) سه ماهه، موجب کاهش وزن بدن و آتروفی قلب شود. همچنین، بدون بررسی تغییرات ترکیب بدنی به ویژه میزان بافت چربی و بدون چربی پس از محدودیت غذایی، نمی توان به جمع بندی دقیقی در مورد افزایش نسبت وزن قلب به وزن بدن و کارایی سیستم قلبی-عروقی رسید. به علاوه، بر اساس یافته های پژوهش حاضر، به نظر می رسد که سه ماه محدودیت غذایی (۵۰- درصد) بر آپوپتوز میوکارد تأثیر قابل توجهی ندارد. هر چند، این احتمال وجود دارد که محدودیت

### References

1. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 2012; 4(5): 330-49.
2. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil* 2013; 9(2): 212-9.
3. Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44(3): 397-405.
4. Hashemi M, Krocak TJ. Apoptosis and autoimmune disease. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2005; 4(4): 429-37.
5. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 105(6): 1934-43.
6. Niemann B, Chen Y, Issa H, Silber RE, Rohrbach S. Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: role of mitochondria. *Cardiovasc Res* 2010; 88(2): 267-76.
7. Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One* 2010; 5(2): e9386.
8. Tejero-Taldo MI, Chmielinska JJ, Weglicki WB. Chronic dietary Mg<sup>2+</sup> deficiency induces cardiac apoptosis in the rat heart. *Magnes Res* 2007; 20(3): 208-12.
9. Selman C, Gredilla R, Phaneuf S, Kendaiah S, Barja G, Leeuwenburgh C. Short-term caloric restriction and regulatory proteins of apoptosis in heart, skeletal muscle and kidney of Fischer 344 rats. *Biogerontology* 2003; 4(3): 141-7.
10. Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers

- oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 2001; 15(9): 1589-91.
11. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res* 2009; 83(2): 247-61.
  12. Hofer T, Servais S, Seo AY, Marzetti E, Hiona A, Upadhyay SJ, et al. Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mech Ageing Dev* 2009; 130(5): 297-307.
  13. Kumar D, Lou H, Singal PK. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz* 2002; 27(7): 662-8.
  14. Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction. *J Nutr Biochem* 2006; 17(8): 501-8.
  15. Li SY, Du M, Dolence EK, Fang CX, Mayer GE, Ceylan-Isik AF, et al. Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification. *Aging Cell* 2005; 4(2): 57-64.
  16. Tsujita Y, Muraski J, Shiraishi I, Kato T, Kajstura J, Anversa P, et al. Nuclear targeting of Akt antagonizes aspects of cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(32): 11946-51.
  17. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Anton SD, Bernabei R, Carter CS, Leeuwenburgh C. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. *Clin Geriatr Med* 2009; 25(4): 715-32, ix.
  18. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 2011; 32(3): 159-221.
  19. Dhahbi JM, Tsuchiya T, Kim HJ, Mote PL, Spindler SR. Gene expression and physiologic responses of the heart to the initiation and withdrawal of caloric restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61(3): 218-31.
  20. Desport JC, Preux PM, Truong TC, Vallat JM, Sautereau D, Couratier P. Nutritional status is a prognostic factor for survival in ALS patients. *Neurology* 1999; 53(5): 1059-63.
  21. Kasarskis EJ, Berryman S, Vanderleest JG, Schneider AR, McClain CJ. Nutritional status of patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to the proximity of death. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(1): 130-7.
  22. James SJ, Muskhelishvili L, Gaylor DW, Turturro A, Hart R. Upregulation of apoptosis with dietary restriction: implications for carcinogenesis and aging. *Environ Health Perspect* 1998; 106(Suppl 1): 307-12.
  23. Dalla LL, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Della BM, Angelini A, et al. Beneficial effects of GH/IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(1): C138-C144.
  24. Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 2006; 79(4): 173-89.
  25. Pecina-Slaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell Int* 2010; 10: 22.
  26. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 19-44.

## Effect of Long-Term Dietary Restriction on Myocardial Apoptosis

Afshar Jafari PhD<sup>1</sup>, Hassan Pourrazi MSc<sup>2</sup>, Saeid Nikookheslat PhD<sup>1</sup>, Behzad Baradaran PhD<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Caloric or dietary restriction (DR) is a practical intervention for weight loss and increasing lifespan. However, the effects of long-term dietary restriction and signaling process of it on cell aging and apoptosis remain unclear, especially in sensitive somatic tissues such as myocardial. Therefore, the purpose of this study was investigating the effect of long-term dietary restriction on some indices of myocardial apoptosis in rats.

**Methods:** This study was conducted with a two-group experimental design (animal model) for three months. Sixteen 3-month-old male Wistar<sub>14848</sub> rats were selected and randomly divided into two groups of dietary restriction (n = 8; weight: 385.25 ± 29.6 g) and control (n = 8; weight: 231.25 ± 27.63 g). All animals in control group were fed ad libitum (0% of dietary restriction; 23.0 ± 2.16 g/day) and animals of dietary-restriction group had daily access to 50% of the intake of the ad libitum-fed control animals (-50% of dietary restriction; 11.5 ± 1.8 g/day). After 3 months, the hearts of rats were extracted and Bax, Bcl2 and caspase-3 mRNA, as important proteins in mitochondrial apoptosis pathway, were evaluated using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) method. Independent t-test was applied for statistical analysis of the data at the significant level of P < 0.05.

**Findings:** The expressions of Bax and Bcl-2 genes in dietary-restriction group were insignificantly higher than the control group (27.7% and 27.9%, respectively). In addition, caspase-3 expression and Bax/Bcl2 ratio in control group were insignificantly higher than the dietary-restriction group (39.4% and 6.9%, respectively).

**Conclusion:** In general, 3-month dietary restriction (-50%) did not affect myocardial apoptosis. However, it likely seems that dietary restriction alleviates myocardial apoptosis via increasing Bcl-2 and decreasing caspase-3.

**Keywords:** Dietary restriction, Myocardial, Apoptosis

**Citation:** Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. **Effect of Long-Term Dietary Restriction on Myocardial apoptosis.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(355): 1758-70

1- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- PhD Student, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine AND Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**Corresponding Author:** Pourrazi Hassan MSc, Email: pourrazi.h@gmail.com

## بررسی تأثیر مکمل اسفرزه (Psyllium) همراه با رژیم کاهش وزن بر شاخص‌های آنزیموتریک و آنزیم‌های کبدی در بزرگسالان چاق یا دارای اضافه وزن

زهرا اکبرزاده<sup>۱</sup>، دکتر مژگان نوریان<sup>۲</sup>، دکتر غلامرضا عسگری<sup>۳</sup>، دکتر محمدرضا مراثی<sup>۴</sup>، دکتر رحمت‌اله رفیعی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** اضافه وزن و چاقی عوامل خطر مهم مرتبط با NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease) هستند. اولین خط درمان NAFLD، کاهش وزن از طریق رژیم غذایی و فعالیت فیزیکی است. فیبر خوراکی اسفرزه (Psyllium)، در جلوگیری و درمان چاقی و پیامدهای آن مؤثر است.

**روش‌ها:** این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، یک کارآزمایی بالینی تصادفی دو سو کور موازی بود. ۸۰ بیمار NAFLD با محدوده‌ی سنی ۷۷-۱۸ سال دارای اضافه وزن ( $BMI \leq 25$ ) (شاخص توده‌ی بدنی یا Body mass index) که بیماریشان به روش الاستوگرافی تأیید شده بود، به روش متوالی انتخاب و توسط بلوک‌های تصادفی دوتایی به دو گروه مورد و شاهد تقسیم شدند. این دو گروه، به ترتیب روزانه ۱۰ گرم Psyllium و ۱۰ گرم تراشه‌ی گندم بدون سبوس مصرف کردند. هر دو گروه، رژیم غذایی کاهش وزن و توصیه‌های افزایش فعالیت بدنی (PA یا Physical activity) دریافت و به مدت ۲/۵ ماه مورد مطالعه قرار گرفتند. دریافت‌های غذایی (با استفاده از پرسش‌نامه‌ی ثبت غذایی سه روزه)، میزان فعالیت بدنی (از طریق پرسش‌نامه‌ی فعالیت فیزیکی)، شاخص‌های آنزیموتریک و آنزیم‌های کبدی آلانین آمینو ترانسفراز (ALT یا Alanine aminotransferase) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST یا Aspartate aminotransferase) به روش فوتومتریک آنزیماتیک در ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** ۱۳ مرد و ۲۵ زن در گروه مورد و ۲۲ مرد و ۱۵ زن در گروه شاهد قرار گرفتند. میانگین سنی افراد ۴۴/۹ بود. پیش از مداخله، شاخص توده‌ی بدنی در گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب ۲۹/۴ و ۳۱/۱ کیلوگرم بر مترمربع و انرژی دریافتی به ترتیب ۲۰۴۴/۸ و ۲۴۴۹/۷ کیلوکالری بود. با کنترل اثر متغیرهای مخدوشگر، مشاهده شد که کالری دریافتی ( $P = 0/020$ )، کربوهیدرات دریافتی ( $P = 0/010$ )، ALT ( $P = 0/006$ )، دور کمر ( $P = 0/006$ )، شاخص توده‌ی بدنی ( $P = 0/006$ ) و وزن ( $P = 0/030$ ) در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌دار یافت و کاهش نسبت دور کمر به دور باسن، در مرز معنی‌دار شدن بود ( $P = 0/050$ ). میزان AST سرمی کاهش معنی‌داری نداشت ( $P = 0/980$ ).

**نتیجه‌گیری:** مصرف Psyllium همراه با رژیم کاهش وزن و فعالیت فیزیکی، می‌تواند در کاهش عوامل خطر بیماری کبد چرب غیر الکلی و کاهش آنزیم‌های کبدی مفید واقع شود.

**واژگان کلیدی:** اسفرزه (Psyllium)، رژیم کاهش وزن، کبد چرب غیر الکلی، شاخص‌های آنزیموتریک، چاقی

**ارجاع:** اکبرزاده زهرا، نوریان مژگان، عسگری غلامرضا، مراثی محمدرضا، رفیعی رحمت‌اله. بررسی تأثیر مکمل اسفرزه (Psyllium) همراه با رژیم کاهش وزن بر شاخص‌های آنزیموتریک و آنزیم‌های کبدی در بزرگسالان چاق یا دارای اضافه وزن. مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۵): ۱۷۷۱-۱۷۸۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تغذیه‌ی جامعه، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی و مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه تغذیه‌ی جامعه، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نجف‌آباد و بیمارستان دکتر علی شریعتی، اصفهان، ایران

## مقدمه

بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD) یا (Non-alcoholic fatty liver disease) در حال حاضر معمول‌ترین نتیجه‌ی بیماری مزمن کبدی در دنیای پیشرفته‌ی امروزی است. پیشرفت این بیماری، از Steatosis به Steatohepatitis و سیروز است و در نهایت، منجر به سرطان و مرگ می‌گردد (۱-۲). از عوامل خطر این بیماری، جنسیت (جنس مذکر)، نژاد، چاقی، سن، مقاومت به انسولین و سندروم متابولیک، افزایش چاقی شکمی (۳-۶)، عدم فعالیت فیزیکی، الگوی رژیم غذایی غربی (۷) (شامل افزایش مصرف کالری، اسیدهای چرب اشباع و افزایش اسیدهای چرب ترانس، کاهش دریافت اسیدهای چرب امگا ۳، کاهش دریافت ویتامین D، کاهش دریافت میوه‌ها و سبزی‌ها) قابل ذکر می‌باشد (۸-۹).

برخی مطالعات نشان داده است که چاقی و سندروم متابولیک، سبب افزایش آسیب سلول‌های کبدی می‌شود (۱۰-۱۱). در یک مطالعه‌ی اپیدمیولوژیک که توسط Bellentani و همکاران انجام شد، شیوع کبد چرب غیر الکلی در افراد چاق بزرگسال ۸۰-۹۰ درصد است (۱۲).

شیوع جهانی NAFLD، به خصوص در کشورهای پیشرفته، در حال افزایش است (۱۳-۱۴). شیوع NAFLD در کشورهای غربی ۲۰-۳۰ درصد و در کشورهای آسیایی ۱۵ درصد است (۸، ۳) و در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲، شیوع بیشتری دارد (۱۴). در ایران ۲۱/۵ درصد از بزرگسالان به این بیماری مبتلا هستند (۵). با مطالعه‌ای بر روی ۲۰۳۰ نفر در کل جمعیت ایران، ۵۸/۸ درصد چربی کبدی ملایم و ۲۰/۶ چربی کبدی متوسط داشتند (۴). همچنین، ۲/۹

درصد افراد مبتلا به Nonalcoholic (NASH) Steatohepatitis بودند (۱۶-۱۵، ۴).

چندین مطالعه‌ی اپیدمیولوژیک نشان داده است که پس از کنترل شاخص توده‌ی بدنی (BMI) یا (Body mass index) به عنوان مخدوشگر، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین چاقی شکمی و بیماری کبد چرب غیر الکلی دیده نشده است (۲۱-۱۷). نتیجه‌ی یک متا آنالیز توسط Pang و همکاران، نشان داد که دور کمر، نسبت دور کمر به دور باسن (WHR یا Waist hip ratio) و BMI به طور غیرمستقیم با NAFLD ارتباط دارند (۲)؛ به هر حال نتایج مطالعات مختلف، متناقض است.

برخی مطالعات نشان داده‌اند که دور کمر در بیماران کبد چرب غیر الکلی، به طور شدیدی با مقاوت به انسولین و افزایش فعالیت آلانین آمینو ترانسفراز ارتباط دارد (۲۴-۲۲). در بیماران NAFLD، پیروی از رژیم غذایی حاوی مقادیر بالای کربوهیدرات، چربی و/یا سطح بالای کلسترول گزارش شده است و از آن جایی که این الگوی غذایی، متابولیسم چربی‌های کبد را تحت تأثیر قرار می‌دهد، ضرورت مداخله‌ی تغذیه‌ای آشکار می‌شود (۲۵). نداشتن فعالیت فیزیکی در این بیماران نیز به عنوان عامل خطر این بیماری در برخی مطالعات بیان شده است (۲۶-۲۷).

در مطالعه‌ی Galisteo و همکاران، اثر ۵ گرم فیبر خوراکی اسفرزه (Psyllium) اضافه شده به هر ۹۵ گرم غذای استاندارد در موش‌های چاق (در سن ۴ هفتگی) سبب تعدیل دیس‌لیپیدمیا، افزایش فشار خون و چاقی در موش‌های چاق شد (۲۸).

در یک متا آنالیز، مصرف ۱۰/۲ گرم مکمل

مبتلا به NAFLD در ایران انجام نشده بود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر مکمل فیبر خوراکی اسفرزه (Psyllium) همراه با رژیم کاهش وزن بر شاخص‌های آنتروپومتریک و آنزیم‌های کبدی در بیماران بزرگسال مبتلا به کبد چرب غیر الکلی دارای اضافه وزن یا چاقی بود.

### روش‌ها

این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، یک کارآزمایی بالینی تصادفی دو سو کور موازی بود که بر روی بیماران دچار NAFLD مراجعه کننده به مرکز کبد چرب بیمارستان دکتر شریعتی اصفهان بر اساس معیارهای ورود و خروج طی ۴ ماه در سال ۱۳۹۳ انجام شد.

شرایط ورود به مطالعه شامل بیماران مبتلا به NAFLD با محدوده‌ی سنی ۱۸-۷۷ سال بود که دچار اضافه وزن و یا چاقی بودند و بیماری آن‌ها از طریق معاینه و یا اندازه‌گیری سطح ALT و بیش از ۴۰ واحد بودن آن (۴) و یا الاستوگرافی (با استفاده از دستگاه فیبرو اسکن ۴۰۲ ساخت کشور فرانسه) مورد تأیید پزشک فوق تخصص قرار گرفته بود.

معیارهای خروج از مطالعه شامل سابقه‌ی مصرف الکل، بارداری و شیردهی، پیروی از رژیم غذایی در سه ماه اخیر، ابتلا به سایر بیماری‌های مزمن کبدی (غیر از بیماری کبد چرب غیر الکلی)، صفراوی، خودایمنی، بدخیمی‌ها و سرطان و درمان دارویی، مصرف داروهای مؤثر بر سطح ALT (کورتیکواستروئیدها، آمیودارون، تاموکسفن، سایکلین‌ها، پرهگزیلین، متوتروکسات هیدرالازین) بود. مصرف داروهای مسهل، قرص OCP (Oral contraceptive pills) و مکمل ویتامین-مینرال

خوراکی Psyllium در ۳۸۴ فرد همراه با رژیم کم‌چرب به مدت ۱۲-۸ هفته، در مقایسه با ۳۷۲ نفر که دارونما به همراه رژیم کم‌چرب مصرف می‌کردند، ۴ درصد کاهش کلسترول سرم و ۷ درصد کاهش LDL (Low density lipoprotein) سرم مشاهده شد و بر روی HDL (High density lipoprotein) تأثیری نداشت (۲۹). مکمل فیبر خوراکی اسفرزه (Psyllium) در جلوگیری و درمان چاقی و بیماری‌های همراه آن در افراد ۱۹-۱۲ ساله مؤثر است (۳۰).

۳/۵ گرم مکمل فیبر خوراکی اسفرزه، به مدت ۶ ماه در ۱۴۱ بیمار چاق مبتلا به فشار خون بالا، منجر به کاهش BMI شد (۳۱). در مطالعه‌ای در کشور پرتغال، افراد بالای ۱۸ سال مبتلا به NAFLD، مصرف ۱۰ گرم مکمل خوراکی اسفرزه به مدت ۳ ماه در ۱۰۰ درصد بیماران سبب کاهش شاخص توده‌ی بدنی، کاهش مقاومت به انسولین و کاهش دور کمر گردید و در ۶۶/۷ درصد از افراد تحت مطالعه، کاهش سطح کلسترول و در ۷۵ درصد از شرکت کنندگان، طبیعی شدن آنزیم‌های کبدی (AST یا aspartate aminotransferase و ALT یا Alanine aminotransferase) مشاهده شد (۳۲).

Psyllium یک منبع طبیعی از فیبر محلول است و به طور کامل بی‌خطر می‌باشد (۳۳-۳۴). از لحاظ بالینی، برای کاهش وزن توصیه شده است (۳۳) و از جانب بیماران قابل پذیرش است و می‌تواند به رژیم افرادی که در برابر رژیم کم‌چرب و کم‌کلسترول به خوبی پاسخ نمی‌دهند، اضافه شود (۳۴).

تا زمان انجام مطالعه‌ی حاضر، پژوهشی بر روی تأثیر مکمل خوراکی Psyllium به همراه رژیم کاهش وزن بر روی بیماران بزرگسال دارای اضافه وزن



یا امگا ۳، از شرایط خروج از مطالعه بودند.

از کلیه‌ی بیماران، رضایت‌نامه‌ی کتبی جهت تمایل به همکاری گرفته شد و به ایشان اطمینان داده شد که تمام اطلاعات فردی آن‌ها محفوظ می‌ماند و در صورت تمایل به انصراف، در هر مرحله از مطالعه امکان خروج خواهند داشت.

تعداد ۸۰ بیمار بزرگ‌سال سرپایی مبتلا به کبد چرب غیر الکلی (۴۳ زن و ۳۷ مرد) دارای  $BMI \geq 25$  به روش نمونه‌گیری متوالی انتخاب شدند و هر دو نفر، یک بلوک دوتایی را تشکیل می‌دادند؛ این بلوک، به صورت تصادفی وارد گروه مورد یا مداخله می‌شد. حجم نمونه با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری  $\alpha = 0/050$  و توان آماری  $1-\beta = 0/800$  و تعداد ۳۵ نفر در هر گروه به دست آمد. سپس، با در نظر گرفتن ۱۰ درصد ریزش احتمالی، تعداد ۴۰ بیمار در هر گروه تعیین شد. مراجعه کنندگان در هر روز به طور تصادفی به یکی از دو گروه مورد یا شاهد (دارونما) وارد شدند و به مدت ۱۰ هفته تحت مطالعه قرار گرفتند.

اطلاعات اولیه‌ی بیماران با استفاده از پرسش‌نامه‌های اطلاعات دموگرافیک (ثبت سه روزه‌ی غذا و فعالیت فیزیکی) جمع‌آوری شد. قد بیماران با قدسنج Seca در حالت ایستاده و بدون کفش با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و وزن افراد با لباس سبک بدون کفش با استفاده از ترازوی Seca با دقت ۱۰۰ گرم در ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. دور کمر نیز در ابتدا و انتهای مطالعه با متر نواری با دقت ۰/۱ سانتی‌متر در باریک‌ترین قسمت در ناحیه‌ی پایین‌ترین دنده و استخوان ایلیاک، و دور باسن با متر نواری با دقت ۰/۱ سانتی‌متر در بیشترین محیط باسن اندازه‌گیری شد.

BMI با استفاده از فرمول تقسیم وزن (کیلوگرم) بر مجذور قد (مترمربع) و نسبت دور کمر به دور باسن (WHR) با تقسیم دور کمر به دور باسن توسط پرستار آموزش دیده در ابتدا و انتهای مطالعه بررسی شد. اندازه‌گیری‌های آنزیم‌های کبدی با استفاده از روش فتومتریک آنزیماتیک (با استاندارد IFCC یا International federation of clinical chemistry) با حساسیت ۲ U/l و ضریب تغییر ۰/۱۴ در ابتدا و انتهای مطالعه تعیین شد (کیت کلریمتریک AST و ALT شرکت پارس آزمون، ایران).

گروه مورد روزانه ۲ پاکت ۵ گرمی فیبر خوراکی اسفرزه (*Planta ovata*) مورد تأیید دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه شاهد نیز روزانه ۲ پاکت دارونما (هر پاکت حاوی ۵ گرم تراشه‌ی گندم بدون سبوس خرد شده با مجموع وزن ۱۰ گرم) دریافت نمودند. به افراد هر دو گروه آموزش داده شد که بایستی هر روز محتوای هر پاکت را با ۲۴۰ سی‌سی آب مخلوط کنند و در دو نوبت قبل از صبحانه و قبل از شام مصرف نمایند.

جهت اجرای دو سو کور این مطالعه، قبل از اجرای آن، مجموعه‌ی پاکت‌های مربوط در بسته‌بندی‌های مشابه با اطلاعات و دستورالعمل یکسان بسته‌بندی شد و توسط فردی به غیر از مداخله‌گر به صورت A و B کدگذاری گردید تا عدم اطلاع مداخله‌گر از نوع پاکت دریافتی توسط هر گروه رعایت شود.

جهت پی‌گیری مصرف مکمل توسط افراد مورد مطالعه، به طور هفتگی با این افراد از طریق تلفن یا پیامک تماس گرفته شد و مقادیر مصرفی ادعا شده پیگیری و اطلاعات لازم دریافت گردید. بیمارانی که بیش از ۱۰ درصد محتوای پاکت‌های خود را مصرف

نکرده بودند، از مطالعه کنار گذاشته شدند.

بیماران گروه‌های مورد و شاهد، توصیه‌های فعالیت بدنی و رژیم کاهش وزن (۸۰۰-۶۰۰ کیلوکالری کاهش کالری دریافتی روزانه) را دریافت نمودند (۳۵)؛ به طوری که محدودیت کالری دریافتی روزانه کمتر از ۳۰ کیلوکالری به ازای هر کیلوگرم وزن بود (۳۶-۳۷). محدودیت محتوای چربی کل رژیم کمتر از ۳۰ درصد کل کالری بود؛ به گونه‌ای که کمتر از ۱۰ درصد از کل کالری به اسیدهای چرب اشباع، اختصاص داده شود (۳۸-۳۹، ۱) و کربوهیدرات دریافتی بین ۵۵-۵۰ درصد از کل انرژی بود و مابقی انرژی به پروتئین اختصاص داده شد. کاهش وزن نباید بیش از ۱/۵-۰/۵ کیلوگرم در هفته می‌بود؛ اگر کاهش وزن بیشتر از ۱/۶ کیلوگرم در هفته رخ دهد، بیماری را وخیم‌تر می‌نماید (۱).

وضعیت رژیم غذایی افراد هر دو گروه به روش ثبت سه روزه‌ی غذایی (3-day food record) به گونه‌ای بود که دو روز هفته و یک روز پایانی هفته را شامل می‌شد، در هفته‌های دوم، چهارم، ششم، هشتم و دهم وضعیت رژیم غذایی بررسی شد. برای آنالیز مواد غذایی، از نرم‌افزار Nutritionist IV نسخه‌ی ۱ (N-Squared Software (NZ) Ltd., New Zealand) استفاده شد. میزان فعالیت بدنی نیز به روش ثبت فعالیت فیزیکی در هفته‌های دوم، چهارم، ششم، هشتم و دهم مطالعه بررسی شد. شرکت کنندگان هر دو گروه در هر بار مراجعه، توصیه‌هایی در جهت افزایش فعالیت‌های فیزیکی روزانه به میزان حداقل نیم ساعت در روز دریافت می‌نمودند.

طبیعی بودن توزیع متغیرها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov چک شد. تجزیه و

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. داده‌های به دست آمده در دو سطح توصیفی (شامل گزارش شاخص گرایش به مرکز، توزیع فراوانی و جدول نتایج) و تحلیلی (شامل آزمون‌های آماری Independent t،  $\chi^2$  و ANCOVA) تحلیل گردید. برای متغیرهای غیر طبیعی، از آزمون‌های غیر پارامتریک Wilcoxon و Mann-Whitney استفاده شد.

### یافته‌ها

از بین ۸۰ نفر شرکت کننده در مطالعه، ۷۵ نفر مطالعه را تکمیل نمودند که میانگین سنی آن‌ها ۴۴/۹ سال بود. ۳۸ نفر در گروه مورد شامل ۱۳ مرد (۳۴/۲ درصد) و ۲۵ زن (۶۵/۸ درصد) و ۳۷ نفر در گروه شاهد شامل ۲۲ مرد (۵۹/۵ درصد) و ۱۵ زن (۴۰/۵ درصد) قرار داشتند. در انتهای مطالعه، پذیرش افراد با شمارش پاکت‌های باقی‌مانده سنجیده شد که در گروه‌های شاهد و مورد به ترتیب، برابر با  $۱/۷۰ \pm ۹۲/۷۵$  و  $۷/۰۰ \pm ۹۴/۰۰$  درصد ارزیابی شد؛ بین پذیرش گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دیده نشد ( $P = ۰/۳۹۰$ ).

۲ بیمار زن از گروه مورد، یکی به دلیل عدم تمایل به مصرف اسفرزه و دیگری به دلیل انجام عمل جراحی و ۳ بیمار از گروه شاهد، یکی به علت مهاجرت به شهر دیگر و ۲ نفر به دلیل عدم تمایل به ادامه‌ی همکاری و مصرف دارونما، از مطالعه خارج شدند. اطلاعات پایه‌ی بیماران در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است. در ابتدای مطالعه، دو گروه از نظر سن، قد، دور کمر، دور باسن، نسبت دور کمر به دور باسن، فعالیت فیزیکی و سطوح AST و ALT تفاوت معنی‌داری نداشتند.

همان‌گونه که در جدول ۳ آمده است، تفاوت

دور باسن که یکی از شاخص‌های آنتروپومتریک بسیار مهم می‌باشد، کاهش یافت و این کاهش، در مرز معنی‌دار شدن بود ( $P = 0/050$ ). دلتای تغییرات ( $\text{Mean change} = 18/6$ ) کاهش وزن ( $P = 0/030$ ) و BMI ( $P = 0/006$ ) نیز معنی‌دار بود.

مطابق جدول ۵، فعالیت بدنی در پایان مطالعه، هم در گروه مورد و هم در گروه شاهد افزایش معنی‌داری ( $P = 0/010$ ) داشت.

معنی‌داری در میزان دریافت کالری ( $P = 0/020$ ) و کربوهیدرات ( $P = 0/010$ ) و سطح ALT سرمی ( $P = 0/006$ ) پس از کنترل متغیرهای مخدوش‌گر (جنس، سن، مصرف سیگار، سطح سواد، انرژی دریافتی و BMI) دیده شد.

پس از کنترل متغیرهای مخدوش‌گر ذکر شده، با توجه به اطلاعات جدول ۴، دور کمر کاهش معنی‌داری یافت ( $P = 0/006$ ). نسبت دور کمر به

جدول ۱. مقایسه‌ی مشخصات افراد مورد بررسی در بدو ورود به مطالعه در دو گروه مورد و شاهد

متغیرها	گروه مورد ( $n = 38$ )	گروه شاهد ( $n = 37$ )	مقدار P* (آماره‌ی آزمون)
مرد تعداد (درصد)	۱۳ (۳۴/۲)	۲۲ (۵۹/۵)	۰/۰۲۸ (۴/۸۰۰)
زن تعداد (درصد)	۲۵ (۶۵/۸)	۱۵ (۴۰/۵)	
سن (سال)	$46/1 \pm 17/1$	$43/8 \pm 11/7$	۰/۶۶۱ (۲/۴۰۰)
متأهل	۳۴ (۸۹/۵)	۳۳ (۸۹/۲)	۰/۹۶۸ (۰/۰۰۲)
مجرد	۴ (۱۰/۵)	۴ (۱۰/۸)	
مصرف سیگار	۶ (۱۵/۸)	۱۵ (۴۰/۵)	۰/۰۱۷ (۵/۶۰۰)
شاخص توده‌ی بدن ( $\text{kg/m}^2$ )	$29/4 \pm 3/4$	$31/1 \pm 3/6$	۰/۰۵۱ (۲/۰۰۰)
قد (cm)	$106/4 \pm 7/4$	$109/5 \pm 9/0$	۰/۰۶۹ (۱/۸۰۰)
وزن (kg)	$77/2 \pm 12/7$	$85/8 \pm 12/2$	۰/۰۵۰ (۲/۹۰۰)
دور کمر (cm)	$102/1 \pm 9/1$	$105/5 \pm 10/3$	۰/۲۱۰ (۱/۲۰۰)
دور باسن (cm)	$106/4 \pm 7/4$	$109/5 \pm 9/0$	۰/۱۰۵ (۱/۶۰۰)
نسبت دور کمر به دور باسن	$0/95 \pm 0/06$	$95/0 \pm 0/0$	۰/۹۲۱ (۰/۱۰۰)
AST (U/l)	$35/7 \pm 19/9$	$51/2 \pm 46/2$	۰/۲۴۵ (۱/۱۰۰)
ALT (U/l)	$46/7 \pm 29/1$	$76/8 \pm 68/1$	۰/۱۱۹ (۱/۵۰۰)
درجه‌ی چربی کبد (kpa)	$6/6 \pm 2/3$	$6/7 \pm 2/0$	۰/۷۸۰ (۰/۱۰۰)

AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase

برای متغیرهای کمی از میانگین  $\pm$  انحراف معیار و برای متغیرهای کیفی از تعداد (درصد) استفاده شده است.

\* مقادیر در دو گروه مورد و شاهد با استفاده از آزمون‌های  $\chi^2$  و t به دست آمد.

جدول ۲. سطوح فعالیت بدنی افراد تحت مطالعه (قبل از انجام مطالعه)

نوع فعالیت بدنی	گروه مورد (تعداد (درصد))	گروه شاهد (تعداد (درصد))	کل (تعداد (درصد))	مقدار P (آماره‌ی آزمون)*
بسیار کم	۱۲ (۵۴/۷)	۱۷ (۴۵/۹)	۲۹ (۳۸/۷)	۰/۴۳۶ (۱/۶۵۰)
کم	۲۳ (۶۰/۵)	۱۸ (۴۸/۶)	۴۱ (۵۴/۷)	
متوسط	۳ (۷/۹)	۲ (۵/۴)	۵ (۶/۷)	

\* بر اساس مقایسه‌ی مقادیر متغیرها قبل از مداخله در هر یک از گروه‌ها با استفاده از آزمون  $\chi^2$  به دست آمده است.

جدول ۳. نتیجه‌ی مقایسه‌ی میانگین دریافت مواد مغذی و آنزیم‌های کبدی در دو گروه مورد و شاهد

متغیر	گروه مورد		تغییرات*** میانگین ± انحراف معیار	مقدار *P	گروه شاهد		تغییرات*** میانگین ± انحراف معیار	مقدار *P	درجه‌ی آزادی		مقدار **P
	میانگین ± انحراف معیار				میانگین ± انحراف معیار				میانگین ± انحراف معیار		
	قبل از مداخله	بعد از مداخله			قبل از مداخله	بعد از مداخله			قبل از مداخله	بعد از مداخله	
انرژی (کیلوکالری)	۲۰۴۴/۸ ± ۵۲۷/۸	۱۶۰۱/۳ ± ۶۲۴/۸	۴۳۳/۴ ± ۵۰۷/۸	< ۰/۰۰۱	۱۷۳۲/۹ ± ۴۶۸/۳	۲۴۴۹/۷ ± ۷۷۸/۴	۷۶۹/۰ ± ۷۶۶/۸	۰/۰۲۰	(۱/۵۹)	۰/۰۲۰	
پروتئین (g)	۶۷/۹ ± ۳۰/۷	۵۸/۹ ± ۳۱/۶	۸/۹ ± ۳۴/۴	۰/۰۱۰	۵۵/۰ ± ۱۸/۳	۷۱/۰ ± ۳۴/۶	۱۷/۶ ± ۴۰/۱	۰/۹۱۰	(۱/۵۹)	۰/۹۱۰	
کربوهیدرات (g)	۲۵۳/۳ ± ۷۹/۱	۲۰۰/۹ ± ۸۰/۵	۵۲/۳ ± ۸۸/۷	۰/۰۲۰	۲۲۷/۹ ± ۵۷/۳	۳۰۱/۷ ± ۱۰۶/۵	۸۰/۰ ± ۱۱۹/۶	۰/۵۹۰	(۱/۵۹)	۰/۵۹۰	
چربی (g)	۸۷/۰ ± ۳۱/۷	۶۳/۴ ± ۳۰/۴	۲۳/۳ ± ۲۹/۸	۰/۰۰۱	۶۸/۵ ± ۳۳/۴	۱۱۱/۹ ± ۵۰/۴	۴۴/۱ ± ۴۸/۵	۰/۰۳۰	(۱/۵۹)	۰/۰۳۰	
فیبر (g)	۱۱۴/۴ ± ۱۴۴/۲	۹۷/۸ ± ۱۰۳/۴	۴۶/۷ ± ۱۵۷/۰	۰/۸۶۰	۱۰۰/۹ ± ۱۱۷/۸	۱۰۶/۵ ± ۱۴۷/۶	۵/۶ ± ۱۸۲/۷	۰/۷۱۰	(۱/۵۹)	۰/۷۱۰	
AST (U/l) <sup>ψ</sup>	۳۵/۷ ± ۱۹/۹	۲۴/۶ ± ۱۱/۳	-	۰/۰۰۱	۳۸/۱ ± ۵۶/۱	۴۶/۲ ± ۵۱/۲	-	۰/۰۲۹	(۱/۶۴)	۰/۰۲۹	
ALT (U/l)	۴۶/۷ ± ۲۹/۱	۲۸/۱ ± ۱۸/۴	۱۸/۶۴ ± ۲۶/۴۶	< ۰/۰۰۱	۴۵/۳ ± ۳۴/۸	۶۸/۱ ± ۷۶/۸	۲۲/۹ ± ۶۷/۹	۰/۰۴۰	(۱/۶۴)	۰/۰۴۰	

AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase

\* مقادیر بر اساس مقایسه‌ی اختلاف مقادیر متغیرها قبل و بعد از مداخله در هر یک از گروه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمون Paired t به دست آمده است؛ \*\* مقادیر بر اساس مقایسه‌ی میانگین‌های بین دو گروه با استفاده از آزمون ANCOVA با کنترل متغیرهای قبل از مداخله (شامل جنس، سن، سطح تحصیلات، مصرف سیگار و شاخص توده‌ی بدنی) به دست آمده است؛ \*\*\* تغییرات با استفاده از کم کردن مقادیر قبل از مداخله از مقادیر بعد از مداخله‌ی هر متغیر به دست آمده است. ۱۷ به دلیل طبیعی نبودن متغیر AST از آزمون‌های غیر پارامتریک Wilcoxon و Mann-Whitney استفاده شده است.

جدول ۴. مقایسه‌ی اندازه‌گیری‌های آنترپومتریک در گروه‌های مورد و شاهد قبل و بعد از مطالعه

متغیر	گروه شاهد		تغییرات*** میانگین ± انحراف معیار	مقدار *P	گروه مورد		تغییرات*** میانگین ± انحراف معیار	مقدار *P	درجه‌ی آزادی		مقدار **P
	میانگین ± انحراف معیار				میانگین ± انحراف معیار				میانگین ± انحراف معیار		
	قبل از مداخله	بعد از مداخله			قبل از مداخله	بعد از مداخله			قبل از مداخله	بعد از مداخله	
دور کمر (cm)	۱۰۵/۰۰ ± ۱۰/۳۰	۱۰۳/۷۰ ± ۱۰/۵۰	۴/۶۳ ± ۵/۰۹	۰/۰۰۶	۱۰۲/۱۰ ± ۹/۱۰	۹۷/۵۰ ± ۹/۰۱	۲/۶۲ ± ۸/۴۳	۰/۰۰۶	(۱/۶۵)	< ۰/۰۰۱	
دور باسن (cm)	۱۰۹/۵۰ ± ۹/۰۰	۱۰۸/۸۰ ± ۸/۲۰	۲/۸۹ ± ۳/۵۴	۰/۰۷۰	۱۰۶/۴۰ ± ۷/۴۰	۱۰۳/۵۰ ± ۸/۳۰	۱/۳۵ ± ۴/۰۹	۰/۰۷۰	(۱/۶۵)	< ۰/۰۰۱	
دور کمر/ دور باسن	۰/۹۵ ± ۰/۰۵	۰/۹۴ ± ۰/۰۵	۰/۰۲ ± ۰/۰۴	۰/۰۶۰	۰/۹۵ ± ۰/۰۶	۰/۹۳ ± ۰/۰۶	-۱/۱۵ ± ۷/۰۸	۰/۰۰۷	(۱/۶۵)	۰/۰۰۷	
شاخص توده‌ی بدنی (kg/m <sup>۲</sup> )	۳۱/۱۰ ± ۳/۶۰	۳۰/۶۰ ± ۳/۸۰	۱/۲۹ ± ۱/۱۳	۰/۰۰۵	۲۹/۴۰ ± ۳/۴۰	۲۸/۱۰ ± ۳/۶۰	-۱/۰۷ ± ۱۰/۲۲	۰/۰۰۱	(۱/۶۵)	< ۰/۰۰۱	
وزن (kg)	۸۵/۸۰ ± ۱۲/۲۰	۸۴/۳۰ ± ۱۲/۶۰	-۲۰/۳۱ ± ۹/۷۳	۰/۰۰۸	۷۷/۲۰ ± ۱۲/۷۰	۷۳/۷۰ ± ۱۲/۸۰	-۱۶/۶۰ ± ۱۴/۲۱	۰/۰۰۱	(۱/۶۵)	< ۰/۰۰۱	

\* مقادیر بر اساس مقایسه‌ی اختلاف مقادیر متغیرها قبل و بعد از مداخله در دو گروه مورد بررسی با استفاده از آزمون Paired t به دست آمده است؛ \*\* بر اساس مقایسه‌ی میانگین‌های بین دو گروه با استفاده از آزمون ANCOVA با کنترل متغیرهای قبل از مداخله (شامل جنس، سن، سطح تحصیلات، مصرف سیگار) به دست آمده است؛ \*\*\* تغییرات با استفاده از کم کردن مقادیر قبل از مداخله از مقادیر بعد از مداخله‌ی هر متغیر به دست آمده است.

جدول ۵. سطوح فعالیت بدنی افراد تحت مطالعه (بعد از انجام مطالعه)

نوع فعالیت بدنی	گروه مورد تعداد (درصد)	گروه شاهد تعداد (درصد)	تعداد کل	مقدار *P (آماره‌ی آزمون)
بسیار کم	۳ (۷/۹)	۱۲ (۳۲/۴)	۱۵ (۲۰/۰)	۰/۰۱۱ (۹/۰۳)
کم	۲۲ (۵۷/۹)	۲۰ (۵۴/۱)	۴۱ (۵۴/۷)	
متوسط	۱۳ (۳۴/۲)	۵ (۱۳/۵)	۱۸ (۲۴/۰)	

\* مقادیر بر اساس مقایسه‌ی مقادیر متغیرها بعد از مداخله در هر یک از گروه‌ها با استفاده از آزمون  $\chi^2$  به دست آمده است.

چرب سمی را به کبد افزایش می‌دهد (۴۵). افزایش اسیدهای چرب آزاد و کاهش بتا اکسیداسیون در کبد، منجر به افزایش تولید گونه‌های رادیکال فعال ROS (Reaction oxygen species) می‌شود و این مسأله سبب استرس اکسیداتیو بیش از حد و التهاب می‌گردد (۴۶، ۷). از این رو، کاهش چاقی شکمی و نسبت دور کمر به دور باسن، می‌تواند در جهت بهبود بیماری NAFLD مؤثر باشد.

Okita و همکاران نشان دادند که محدودیت انرژی دریافتی رژیمی به میزان روزانه ۲۵ کیلوکالری به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، می‌تواند منجر به کاهش وزن و بهبود آنزیم‌های کبدی شود (۴۷). هم‌راستا با مطالعه‌ی حاضر، مطالعات قبلی نشان داده است که رفتار درمانی در رابطه با تغییر در رژیم غذایی و فعالیت فیزیکی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی می‌تواند مفید باشد (۴۸-۴۹). مشاوره در جهت تغییر سبک زندگی، می‌تواند منجر به افزایش فعالیت فیزیکی شود و افزایش فعالیت فیزیکی یا ثابت نگه داشتن آن، مستقل از ایجاد تغییرات وزن، برای بیماران NAFLD مفید خواهد بود (۵۰).

از دلایل احتمالی کاهش معنی‌دار شاخص‌های آنترپومتریک و آنزیم‌های کبدی در گروه دریافت‌کننده‌ی دارونما، می‌توان به موارد احتمالی از قبیل

## بحث

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تجویز روزانه‌ی ۱۰ گرم اسفرزه به همراه رژیم کاهش وزن به مدت ۱۰ هفته، می‌تواند باعث بهبود بیماری کبد چرب شود.

در مطالعه‌ی Bruce و Byrne نشان داده شد که مصرف غذاهای سرشار از اسیدهای چرب غیر اشباع امگا ۳، میوه، سبزی، غذاهایی با شاخص گلیسمیک پایین و غذاهای پر فیبر جهت کاهش عوامل مؤثر در پاتوژنز بیماری NAFLD مفید می‌باشد (۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز مطابق با نتایج مطالعات قبلی، کاهش تدریجی وزن (۳۹-۳۸، ۷) به طور تقریبی معادل ۱۰-۵ درصد از کل وزن اولیه‌ی بدن با استفاده از تغییرات رژیم غذایی منجر به کاهش برخی شاخص‌های آنترپومتریک (۴۱-۴۰، ۲۱-۱۸) و بهبود بافت‌شناسی در بیماری کبد چرب گردید (۴۰، ۱۸).

در مطالعه‌ای که توسط Ruhl و Everhart انجام شد، چاقی شکمی، افزایش چربی خون و افزایش سطوح انسولین، بیشترین ارتباط را با چاقی نشان داد که در نهایت، منجر به افزایش فعالیت ALT سرمی می‌گردد (۴۲). افزایش نسبت دور کمر به دور باسن (WHR) بیشترین ارتباط را با افزایش فعالیت ALT دارد (۴۳-۴۴). افزایش WHR همبستگی شدیدی با چربی‌های احشایی دارد که شانس ورود اسیدهای

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان جمعیت کم مورد مطالعه و زمان مداخله‌ی کوتاه و نداشتن دوره‌ی پی‌گیری پس از پایان مداخله (Follow-up) و نیز عدم همسان‌سازی افراد مورد مطالعه در دو گروه مورد و شاهد در ابتدای مطالعه از نظر وزنی و جنسی، میزان انرژی مصرفی و یکسان نبودن فعالیت فیزیکی دو گروه در انتهای مطالعه را ذکر کرد.

به عنوان نتیجه‌گیری نهایی، به نظر می‌رسد مصرف مکمل فیبر خوراکی اسفرزه به همراه رژیم کاهش وزن و توصیه به افزایش فعالیت فیزیکی، می‌تواند سبب کنترل شاخص‌های آنروپومتریکی به ویژه چاقی شکمی و کاهش سطح سرمی آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز و به دنبال آن، تأخیر آسیب کبدی یا جلوگیری از پیشرفت آن در بیماران NAFLD گردد. جهت تأیید نتایج حاصل از این مطالعه، در آینده انجام مطالعات با جمعیت‌های بیشتر و زمان مداخله‌ی طولانی‌تر همراه با دوره‌ی پی‌گیری پس از پایان مداخله توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۴۳۲۷ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. بدین وسیله، نویسندگان این مقاله از مقامات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و جناب آقای دکتر رحمت‌اله رفیعی جهت تأمین بخشی از منابع مالی این پژوهش، و از مدیریت و کارکنان مرکز تحقیقات حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان و بیمارستان دکتر شریعتی اصفهان و سرکار خانم ناهید صادقی جهت همکاری در اجرای این طرح تقدیر و تشکر می‌نمایند.

افزایش حساسیت این افراد نسبت به رعایت رژیم غذایی - به دلیل وجود سطح تحصیلات بالاتر در این گروه - اشاره نمود. همچنین، اثرات دارونما (Placebo effect) را نیز می‌توان ذکر کرد. پس از کنترل متغیرهای مخدوش‌گر (سطح تحصیلات، سن، جنس، انرژی دریافتی، BMI و مصرف سیگار)، می‌توان نتیجه گرفت که این اثر ممکن است ناشی از مصرف مکمل فیبر خوراکی اسفرزه باشد. فیبر موجود در اسفرزه، می‌تواند سبب کاهش سرعت تخلیه‌ی معده و کاهش جذب درشت مغذی‌ها و در نهایت سبب کاهش ترشح انسولین و کاهش وزن شود. از طرف دیگر، از طریق تخمیر اسیدهای چرب کوتاه زنجیر موجود در دستگاه گوارش، سبب کاهش تولید گلوکز کبدی و افزایش اکسیداسیون چربی و کاهش ذخیره‌ی چربی و در نهایت به تأخیر انداختن آسیب کبدی یا جلوگیری از پیشرفت آن در بیماران NAFLD می‌گردد (۵۱). همچنین، به علت افزایش فعالیت فیزیکی در گروه مورد پس از انجام مطالعه، تغییرات حاصل را می‌توان به اثر معنی‌دار فعالیت فیزیکی نسبت داد.

از نقاط قوت این مطالعه، می‌توان به انجام مطالعه برای اولین بار در ایران، ویزیت بیماران هر دو هفته یک بار و دریافت رژیم غذایی که برای هر نفر با توجه به شرایط اقتصادی و عادات غذایی معمول افراد تنظیم شده بود، اشاره کرد. همچنین، به این دلیل که بعضی از بیماران با وجود سطح ALT طبیعی به عنوان بیمار کبد چرب غیر الکلی شناخته می‌شوند، در تشخیص اولیه‌ی بیمارانی که وارد مطالعه شدند، علاوه بر اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی، از روش الاستوگرافی توسط پزشک فوق تخصص استفاده شد.

## References

- Naniwadekar AS. Nutritional recommendation for patient with non-alcoholic fatty liver disease: An evidence base review. *Practical Gastroenterology* 2010; 82: 8-16.
- Pang Q, Zhang JY, Song SD, Qu K, Xu XS, Liu SS, et al. Central obesity and nonalcoholic fatty liver disease risk after adjusting for body mass index. *World J Gastroenterol* 2015; 21(5): 1650-62.
- Paschos P, Paletas K. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009; 13(1): 9-19.
- Rogha M, Najafi N, Azari A, Kaji M, Pourmoghaddas Z, Rajabi F, et al. Non-alcoholic Steatohepatitis in a Sample of Iranian Adult Population: Age is a Risk Factor. *Int J Prev Med* 2011; 2(1): 24-7.
- Lankarani KB, Ghaffaripasand F, Mahmoodi M, Lotfi M, Zamiri N, Heydari ST, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in southern Iran: a population based study. *Hepat Mon* 2013; 13(5): e9248.
- Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad Med J* 2009; 85(1009): 614-21.
- Magosso E, Ansari MA, Gopalan Y, Shuaib IL, Wong JW, Khan NA, et al. Tocotrienols for normalisation of hepatic echogenic response in nonalcoholic fatty liver: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Nutr J* 2013; 12(1): 166.
- Conlon BA, Beasley JM, Aebersold K, Jhangiani SS, Wylie-Rosett J. Nutritional management of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients* 2013; 5(10): 4093-114.
- Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007; 46(4): 1081-90.
- Lv WS, Sun RX, Gao YY, Wen JP, Pan RF, Li L, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and microvascular complications in type 2 diabetes. *World J Gastroenterol* 2013; 19(20): 3134-42.
- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34(3): 274-85.
- Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010; 28(1): 155-61.
- Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol* 2009; 50(1): 204-10.
- Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172(7): 899-905.
- Lirussi F, Mastropasqua E, Orando S, Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1): CD005165.
- Sohrabpour A, Rezvan H, Amini-Kafiabad S, Dayhim M, Merat S, Pourshams A. Prevalence of Nonalcoholic Steatohepatitis in Iran: A Population based Study. *Middle East J Dig Dis* 2010; 2(1): 14-9.
- Harvie M, Hooper L, Howell AH. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obes Rev* 2003; 4(3): 157-73.
- Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 51(1): 121-9.
- Elias MC, Parise ER, de Carvalho L, Szejnfeld D, Netto JP. Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition* 2010; 26(11-12): 1094-9.
- Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004; 53(3): 413-9.
- Lang HF, Chou CY, Sheu WH, Lin JY. Weight loss increased serum adiponectin but decreased lipid levels in obese subjects whose body mass index was lower than 30 kg/m<sup>2</sup>. *Nutr Res* 2011; 31(5): 378-86.
- Paniagua JA, Escandell-Morales JM, Gil-Contreras D, Berral de la Rosa FJ, Romero-Jimenez M, Gomez-Urbano A, et al. Central obesity and altered peripheral adipose tissue gene expression characterize the NAFLD patient with insulin resistance: Role of nutrition and insulin challenge. *Nutrition* 2014; 30(2): 177-85.
- Fraser A, Longnecker MP, Lawlor DA. Prevalence of elevated alanine aminotransferase among US adolescents and associated factors: NHANES 1999-2004. *Gastroenterology* 2007; 133(6): 1814-20.
- Guidorizzi de Siqueira AC, Cotrim HP, Rocha R, Carvalho FM, de Freitas LA, Barreto D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin

- resistance: importance of risk factors and histological spectrum. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17(8): 837-41.
25. Yasutake K, Kohjima M, Nakashima M, Kotoh K, Nakamuta M, Enjoji M. Nutrition therapy for liver diseases based on the status of nutritional intake. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012: 1-8.
  26. Sanchez-Munoz V, Salas-Romero R, Del Villar-Morales A, Martinez-Coria E, Pegueros-Perez A, Franco-Sanchez JG. Decrease of liver fat content by aerobic exercise or metformin therapy in overweight or obese women. *Rev Invest Clin* 2013; 65(4): 307-17. [In Spanish].
  27. Kistler KD, Brunt EM, Clark JM, Diehl AM, Sallis JF, Schwimmer JB. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(3): 460-8.
  28. Galisteo M, Sanchez M, Vera R, Gonzalez M, Anguera A, Duarte J, et al. A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF-alpha in obese Zucker rats. *J Nutr* 2005; 135(10): 2399-404.
  29. Anderson JW, Allgood LD, Lawrence A, Altringer LA, Jerdack GR, Hengehold DA, et al. Cholesterol-lowering effects of psyllium intake adjunctive to diet therapy in men and women with hypercholesterolemia: meta-analysis of 8 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(2): 472-9.
  30. Carlson JJ, Eisenmann JC, Norman GJ, Ortiz KA, Young PC. Dietary fiber and nutrient density are inversely associated with the metabolic syndrome in US adolescents. *J Am Diet Assoc* 2011; 111(11): 1688-95.
  31. Cicero AF, Derosa G, Manca M, Bove M, Borghi C, Gaddi AV. Different effect of psyllium and guar dietary supplementation on blood pressure control in hypertensive overweight patients: a six-month, randomized clinical trial. *Clin Exp Hypertens* 2007; 29(6): 383-94.
  32. Rocha R, Cotrim HP, Siqueira AC, Floriano S. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment with soluble fibres. *Arq Gastroenterol* 2007; 44(4): 350-2. [In Portuguese].
  33. Saper RB, Eisenberg DM, Phillips RS. Common dietary supplements for weight loss. *Am Fam Physician* 2004; 70(9): 1731-8.
  34. Anderson JW, Floore TL, Geil PB, O'Neal DS, Balm TK. Hypocholesterolemic effects of different bulk-forming hydrophilic fibers as adjuncts to dietary therapy in mild to moderate hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* 1991; 151(8): 1597-602.
  35. Palmer M, Schaffner F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology* 1990; 99(5): 1408-13.
  36. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37(4): 917-23.
  37. Vajro P, Mandato C, Franzese A, Ciccimarra E, Lucariello S, Savoia M, et al. Vitamin E treatment in pediatric obesity-related liver disease: a randomized study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38(1): 48-55.
  38. Yasutake K, Kohjima M, Kotoh K, Nakashima M, Nakamuta M, Enjoji M. Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(7): 1756-67.
  39. Zelber-Sagi S, Ratzu V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 2011; 17(29): 3377-89.
  40. Ghaemi A, Taleban FA, Hekmatdoost A, Rafiei A, Hosseini V, Amiri Z, et al. How Much Weight Loss is Effective on Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Hepat Mon* 2013; 13(12): e15227.
  41. North CJ, Venter CS, Jerling JC. The effects of dietary fibre on C-reactive protein, an inflammation marker predicting cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63(8): 921-33.
  42. Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2003; 124(1): 71-9.
  43. Kral JG, Schaffner F, Pierson RN, Jr., Wang J. Body fat topography as an independent predictor of fatty liver. *Metabolism* 1993; 42(5): 548-51.
  44. Banerji MA, Buckley MC, Chaiken RL, Gordon D, Lebovitz HE, Kral JG. Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulin-sensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19(12): 846-50.
  45. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis.* 2001; 21(1): 17-26.
  46. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; 54(7): 987-93.
  47. Okita M, Hayashi M, Sasagawa T, Takagi K,



- Suzuki K, Kinoyama S, et al. Effect of a moderately energy-restricted diet on obese patients with fatty liver. *Nutrition* 2001; 17(7-8): 542-7.
48. Bellentani S, Dalle GR, Suppini A, Marchesini G. Behavior therapy for nonalcoholic fatty liver disease: The need for a multidisciplinary approach. *Hepatology* 2008; 47(2): 746-54.
49. Jun DW. The role of diet in non-alcoholic fatty liver disease. *Korean J Gastroenterol* 2013; 61(5): 243-51. [In Korean].
50. Gutierrez-Grobe Y, Gavilanes-Espinar JG, Mendez-Sanchez N. Physical activity and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2009; 8(3): 273-4.
51. Slavin JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 2005; 21(3): 411-8.

## The Effect of Psyllium on Anthropometric Measurements and Liver Enzymes in Overweight or Obese Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

Zahra Akbarzadeh<sup>1</sup>, Mojgan Nourian PhD<sup>2</sup>, Gholamreza Askari PhD<sup>2</sup>,  
Mohammad Reza Maracy PhD<sup>3</sup>, Rahmatollah Rafiei MD<sup>4</sup>

### Original Article

### Abstract

**Background:** Overweight and obesity are two important risk factors for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Controlling the weight via using dietary fiber may help to manage patients with NAFLD by diet and physical activity. Psyllium as a fiber can reduce obesity and its consequences.

**Methods:** This was a placebo-controlled, double-blind, randomized clinical trial study. 80 overweight or obese patients with NAFLD (age: 18-77 years) diagnosis via elastography were enrolled. Participants assigned to intervention and placebo groups using randomized block design; which were supplemented with 10 g psyllium or 10 g ground wheat, respectively. Both groups followed weight-loss diet and physical activity (PA) recommendations for 10 weeks. Serum liver enzymes (using enzymatic photometric method), dietary intake (via 3-day food record) physical activity (using physical activity questionnaire) and anthropometric measurements were assessed at baseline and the end of the study.

**Findings:** 75 participants (mean age: 44.9 years) met the inclusion criteria, 13 men and 25 women in intervention group and 22 men and 15 women in placebo group. At the beginning, the mean body mass index (BMI) was 29.4 and 31.1 kg/m<sup>2</sup> and the mean calorie intake was 2044.8 and 2449.7 kcal in intervention and placebo groups, respectively. Controlling the confounding variables, calorie intake (P = 0.020), carbohydrate intake (P = 0.010), serum alanine aminotransferase (ALT) (P = 0.006), waist circumference (P = 0.006), body mass index (P = 0.006) and weight (P = 0.030) were reduced in intervention group as compared with placebo group. Waist to hip ratio reduced at a boarderline significance (P = 0.050); and serum aspartate aminotransferase (AST) reduced insignificantly (P = 0.980).

**Conclusion:** Weight-loss diet program supplemented with psyllium, in parallel with increasing the physical activity, can be useful in reducing NAFLD outcomes.

**Keywords:** Psyllium, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), Obesity, Waist to hip ratio, Dietary intake

**Citation:** Akbarzadeh Z, Nourian M, Askari Gh, Maracy MR, Rafiei R. **The Effect of Psyllium on Anthropometric Measurements and Liver Enzymes in Overweight or Obese Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD).** J Isfahan Med Sch 2015; 33(355): 1771-83

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

2- Assistant Professor, Department of Community Nutrition, School of Food Science and Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Najafabad Branch, Islamic Azad University AND Shariati Hospital, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Mojgan Nourian PhD, Email: [nourian@hlth.mui.ac.ir](mailto:nourian@hlth.mui.ac.ir)

## بررسی اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت در استان اصفهان در سال ۱۳۹۱

مهدی محمدیان<sup>۱</sup>، حمید صالحی نیا<sup>۲</sup>، سلمان خزایی<sup>۳</sup>، جواد رمضان پور<sup>۴</sup>، عبدالله محمدیان هفشجانی<sup>۵</sup>

### مقاله کوتاه

#### چکیده

**مقدمه:** بیماری بروسلوز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد که از طریق دام آلوده به انسان انتقال می‌یابد. هدف این مطالعه، بررسی خصوصیات اپیدمیولوژیک بیماران مبتلا به تب مالت در سال ۱۳۹۱ در استان اصفهان بود.

**روش‌ها:** مطالعه‌ی حاضر به صورت مقطعی توصیفی-تحلیلی بر روی کلیه‌ی افراد مبتلا به بیماری تب مالت که در طی سال ۱۳۹۱ در استان اصفهان شناسایی شده بودند، انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های مطالعه با استفاده از آزمون‌های  $\chi^2$  و t و نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. میزان‌های بروز بر اساس صد هزار نفر جمعیت در معرض خطر در سال ۱۳۹۱ محاسبه و ارائه شد.

**یافته‌ها:** در مجموع، تعداد ۵۷۵ مورد بیمار مبتلا به تب مالت شناسایی شدند که ۶۹/۹ درصد از بیماران را مردان و ۸۷/۷ درصد را افراد روستایی تشکیل می‌دادند. زنان خانه‌دار- دامدار بیشترین و کودکان کمترین نسبت بیماران را تشکیل می‌دادند. میزان بروز بیماری در طی سال ۱۳۹۱ در سطح استان اصفهان برابر با ۱۳/۱۱ بود که این میزان در مردان ۴/۱۵، در زنان ۹/۶۴، در مناطق شهری ۱/۷ و در مناطق روستایی ۱۲/۰۹ در صد هزار نفر بود. همچنین، بین نوع بیماری (مورد جدید و یا عود) و شهرستان محل سکونت و سابقه‌ی تماس با دام ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده شد ( $P > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** میانگین میزان بروز تب مالت در استان اصفهان کمتر از متوسط کشوری بود و این استان، جزء استان‌های با بروز بسیار کم طبقه‌بندی می‌شود. همچنین، اختلاف در توزیع جغرافیایی بیماری در سطح شهرستان‌های استان اصفهان بارز می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** بروسلوز، بروز، اپیدمیولوژی، ایران

**ارجاع:** محمدیان مهدی، صالحی نیا حمید، خزایی سلمان، رمضان پور جواد، محمدیان هفشجانی عبدالله. بررسی اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت

در استان اصفهان در سال ۱۳۹۱. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۵): ۱۷۸۴-۱۷۹۵

#### مقدمه

بیماری بروسلوز یکی از بیماری‌های زئونوز (مشترک انسان و دام) می‌باشد که از طریق دام آلوده به انسان انتقال می‌یابد. نام‌های دیگر این بیماری، تب مواج و تب

مدیترانه‌ای است (۱). این بیماری با کاهش بهره‌وری، سقط و ضعف در دام‌ها، موجب افت چشم‌گیر در سرمایه‌های اقتصادی کشورها می‌شود (۲). راه‌های انتقال بیماری به انسان بدین شرح می‌باشند:

- ۱- کارشناس ارشد، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
  - ۲- پژوهشگر، مرکز تحقیقات جراحی‌های کم تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران و دانشجوی دکتری اپیدمیولوژی، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
  - ۳- دانشجوی دکتری، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
  - ۴- کارشناس، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
  - ۵- اپیدمیولوژیست، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان و دانشجوی دکتری، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- نویسنده‌ی مسؤول: عبدالله محمدیان هفشجانی
- Email: a\_mohamadii@yahoo.com

طبق گزارش سازمانی جهانی بهداشت، در جهان سالیانه حدود ۵۰۰۰۰۰ بیمار مبتلا به تب مالت شناسایی و گزارش می‌شوند. البته تخمین زده می‌شود که حتی در کشورهای پیشرفته، تنها ۱۰-۴ درصد مواد بروسلوز تشخیص داده می‌شوند (۴-۵). بیماری در منطقه‌ی جنوب شرقی مدیترانه آندمیک می‌باشد. در ایران نیز با وجود سیستم بهداشتی و درمانی مناسب، این بیماری هنوز به صورت آندمیک حضور دارد. ایران از نظر بروز بیماری بروسلوز در رتبه‌ی چهارم جهانی (۶-۸) و رتبه‌ی اول منطقه‌ی مدیترانه‌ی شرقی قرار دارد (۹). در طی ۱۸ سال گذشته، به طور متوسط در هر سال ۲۷۵۰۰ مورد جدید بیماری در کشور گزارش شده است (۱۰).

تب مالت در تمام نقاط کشور پراکنده است، اما وفور آن در مناطق مختلف، یکسان نیست (۱۰). علت انتشار این بیماری در انسان، عفونت در دام‌های اهلی و وحشی می‌باشد (۶). این بیماری در گاو به طور معمول توسط *Brucella abortus* و گاهی *Brucella melitensis* و در گوسفند و بز، توسط *Brucella melitensis* و گاهی *Brucella ovis* و *Brucella abortus* ایجاد می‌شود. در این بین، *Brucella melitensis* باعث شدیدترین نوع بیماری در انسان می‌گردد (۲) و اکثر موارد، تب مالت انسانی در ایران ناشی از این ارگانیزم می‌باشد (۱۱). *Brucella abortus* می‌تواند باعث شکل تحت حاد بیماری شود و *Brucella ovis* در انسان بیماری‌زا نمی‌باشد (۱۲).

یکی از مهم‌ترین پیش‌نیازها جهت اعمال برنامه‌های مناسب بهداشتی جهت پیش‌گیری، کنترل و ریشه‌کنی بیماری در هر منطقه، در اختیار داشتن آمار

۱- از طریق دستگاه گوارش شامل خوردن شیر خام و سایر فراورده‌های لبنی غیر پاستوریزه و آلوده به خصوص پنیر تازه و سرشیر (به نظر می‌رسد عمده‌ترین راه انتقال بیماری در ایران از طریق دستگاه گوارش باشد).

۲- از طرق دستگاه تنفس همانند استنشاق هوای آلوده‌ی آغل، کشتارگاه و آزمایشگاه

۳- از طریق خراش‌های پوستی و تماس با گوشت، جفت، خون، ادرار، جنین سقط شده و نسوج دام آلوده

۴- از طریق ملتحمه‌ی چشم

۵- از طریق انتقال خون و مغز استخوان

۶- از طریق جفت که به ندرت باعث عفونت نوزاد می‌شود.

۷- از طریق مقاربت که بسیار نادر است.

۸- از طریق فرو رفتن اتفاقی سر سوزن حاوی واکسن دامی در زمان تلقیح واکسن به گوسفند و گاو به دست واکسیناتور (۱).

بیماری به طور عمده در افراد جوان که از نظر اجتماعی و اقتصادی فعال هستند، در روستاییان و همچنین در مردان بیشتر دیده می‌شود (۳، ۱). بروز این بیماری در کشورهای دنیا بسیار متفاوت است؛ به گونه‌ای که در نقشه‌ای که به منظور تعیین پراکندگی جهانی بیماری رسم شده است، در برخی از مناطق مثل آمریکای شمالی، استرالیا و کانادا، بیماری بسیار نادر است (میزان بروز کمتر از ۲ نفر در صد هزار نفر جمعیت)، در حالی که در برخی مناطق مثل مغولستان و سوریه، بروز بیماری از ۵۰۰ مورد در صد هزار نفر جمعیت بیشتر می‌باشد. در این بین، برای کشور ایران میزان بروز در حدود ۵۰-۵۰۰ مورد در هر صد هزار نفر ذکر شده است.

بیمارستان‌ها، کلینیک‌ها و مطب‌های خصوصی، آزمایشگاه‌ها و ... که در بخش دولتی و خصوصی فعال می‌باشند، باید در صورت برخورد با هر یک از بیماری‌های مشمول گزارش، آن‌ها را برای ثبت در نظام مراقبت و پی‌گیری موارد بروز و اقدامات کنترلی به مراکز بهداشت گزارش نمایند، تا تیم بررسی مرکز بهداشت شهرستان نسبت به پی‌گیری بیمار و اطرافیان، بر اساس نوع بیماری اقدام کنند.

بیماری تب مالت جزء بیماری‌های مشمول گزارش غیر فوری طبقه‌بندی می‌شود که باید موارد جدید و یا عود بیماری به صورت هفتگی یا ماهیانه به سطح بالاتر گزارش گردند. بر این اساس، هر بیمار دارای علائم بالینی سازگار با بیماری تب مالت همراه با ارتباط اپیدمیولوژیک با موارد حیوان مشکوک یا قطعی مبتلا به بروسلاز یا فراورده‌های آلوده حیوانی تحت عنوان مورد مشکوک و هر مورد مشکوکی که آزمایش Wright آن دارای تیتراژ مساوی یا بیشتر از  $1/80$  باشد، تحت عنوان مورد محتمل و هر مورد مشکوک یا محتملی که با معیار تشخیص‌های قطعی آزمایشگاهی همراه باشد، به عنوان مورد قطعی دسته‌بندی می‌شود.

از آن جایی که اکثر بیماران به صورت سرپایی در مراکز درمانی دولتی و خصوصی تشخیص داده شده، درمان می‌شوند، جهت پوشش بالای موارد بیماری در سیستم بهداشتی استان، علاوه بر این که اطلاعات مربوط به بیماران مبتلا به بیماری تب مالت از کلیه مراکز بهداشتی و درمانی و بیمارستان‌های دولتی بر اساس فرم بررسی موارد بیماری به صورت ماهیانه به مرکز بهداشت شهرستان گزارش می‌گردد، مراقبت فعال نیز در هر شهرستان توسط یک یا چند نفر

و اطلاعات اپیدمیولوژیک مناسب می‌باشد. از این رو، با توجه به این که این بیماری در استان اصفهان در طی سالیان گذشته همواره به صورت آندمیک حضور داشته و به نوعی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در این منطقه بوده است، این مطالعه جهت بررسی جنبه‌های اپیدمیولوژیک و بروز بیماری در طی سال ۱۳۹۱ در استان اصفهان انجام شد.

## روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی مقطعی توصیفی-تحلیلی بود که بر روی کلیه‌ی افراد مبتلا به بیماری تب مالت که در طی سال ۱۳۹۱ در سطح استان اصفهان توسط بخش خصوصی و دولتی شناسایی شده بودند و جهت ایشان فرم بررسی بیمار مبتلا به تب مالت تکمیل شده بود، انجام گردید.

در نظام مراقبت بیماری در کشور ایران، جهت این که همه‌ی افراد از برداشت مشترکی در زمینه‌ی مفاهیم و روش‌های فنی در این حیطه برخوردار باشند و در گزارش بیماری‌ها فعالانه مشارکت داشته باشند و همچنین جهت هماهنگی و یکدستی اقدامات در سطح کشور، تعاریفی را برای بیماری‌های مشمول گزارش‌دهی و شیوه‌ی گزارش آن تدوین نموده‌اند که بر اساس علائم و نتایج آزمایشگاهی بیماری‌ها، طبقه‌بندی بیماری‌ها (مشکوک، محتمل و قطعی) انجام می‌شود و در کل کشور از این تعاریف برای گزارش بیماری‌های واگیر استفاده می‌گردد. در صورتی که یک بیماری با تعاریف اپیدمیولوژیک هم‌خوانی داشته باشد، در نظام مراقبت بیماری‌ها باید به سطح بالاتر گزارش شود. بر این اساس، کلیه‌ی خانه‌های بهداشت، مراکز بهداشتی و درمانی،

که ۳۰/۱ درصد (۱۷۳ مورد) از بیماران را زنان و ۶۹/۹ درصد (۴۰۲ مورد) را مردان تشکیل می‌دادند. نسبت مرد به زن ۲/۳۲ بود.

تعداد موارد بیماری در گروه‌های سنی مختلف، متفاوت بود؛ به گونه‌ای که بیشترین تعداد موارد در گروه سنی ۲۰-۳۰ ساله و کمترین آن در گروه‌های سنی ۱۰-۰ ساله بود. ۱۲/۴ درصد (۷۱ مورد) از بیماران ساکن مناطق شهری و ۸۷/۷ درصد (۵۰۴ مورد) از بیماران ساکن مناطق روستایی بودند. از نظر شغلی ۱۸/۸ درصد (۱۰۸ مورد) از بیماران دامدار، ۱۵/۷ درصد (۹۰ مورد) کشاورز و دامدار، ۲۱/۶ درصد (۱۲۴ مورد) زنان خانه‌دار و دامدار، ۹/۶ درصد (۵۵ مورد) دانش‌آموز و ۸/۲ درصد (۴۷ مورد) کارگر و ۱۶/۶۹ درصد (۹۶ مورد) در سایر گروه‌های شغلی بودند و در خصوص شغل ۹/۶ درصد افراد (۵۵ مورد) نیز اطلاعاتی ثبت نشده بود. از نظر سطح تحصیلات، ۲۸/۵ درصد (۱۶۴ مورد) بیماران بی‌سواد، ۲۸/۵ درصد (۱۶۴ مورد) دارای تحصیلات ابتدایی، ۲۷/۷ درصد (۱۵۹ مورد) دارای تحصیلات سیکل، ۱۴/۳ درصد (۸۲ مورد) دیپلم و ۱ درصد (۶ مورد) از بیماران دارای تحصیلات دانشگاهی بودند.

میانگین سنی بیماران در زمان ابتلا به بیماری،  $17/46 \pm 36/25$  سال بود. در مقایسه‌ی میانگین سنی بیماران بر اساس جنسیت مشاهده گردید که میانگین سنی در زمان ابتلا به تب مالت در مردان  $17/38 \pm 34/17$  سال و در زنان  $41/09 \pm 16/71$  سال بود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P = 0/906$ ). در مقایسه‌ی میانگین سنی بین بیماران شهری و روستایی، مشاهده گردید که میانگین سنی در بیماران شهری برابر  $19/34 \pm 37/69$  سال و برای

کاردان و یا کارشناس مبارزه با بیماری‌ها انجام می‌شود. در این برنامه، پرسنل بهداشتی که مسئول انجام برنامه‌ی مراقبت فعال می‌باشند، به صورت ماهیانه از مراکز تشخیصی و درمانی خصوصی و دولتی سطح شهرستان بازدید می‌نمایند و اطلاعات دموگرافیک بیماران را از این مراکز دریافت می‌کنند و جهت تکمیل فرم بررسی با افراد بیمار تماس می‌گیرند و اطلاعات مورد نیاز جهت تکمیل فرم‌های بررسی موارد جدید و یا عود بیماری را گردآوری و تکمیل می‌نمایند (۴). بنا بر این، بدین وسیله سعی می‌شود که اکثریت موارد بیماری شناسایی شوند.

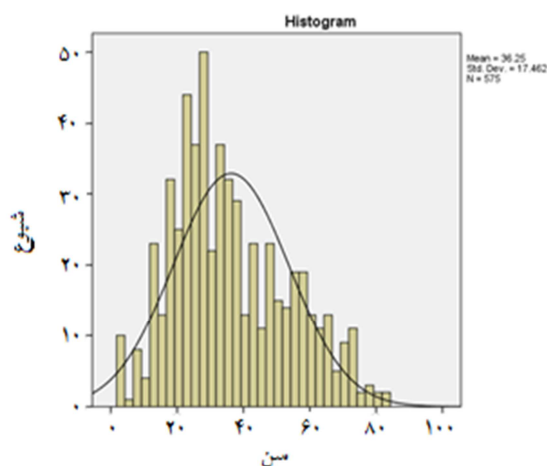
در مرکز بهداشت شهرستان، موارد بیماری باید در برنامه‌ی پرتال معاونت سلامت وزارت بهداشت وارد شوند. در این مطالعه، اطلاعات سال ۱۳۹۱ استان اصفهان از پرتال معاونت سلامت دریافت شد (اطلاعات مربوط به شهرستان کاشان به علت این که دارای دانشگاه علوم پزشکی مستقل از اصفهان می‌باشد، در مطالعه محاسبه نشده است).

تجزیه و تحلیل داده‌های مطالعه با استفاده از آزمون‌های  $\chi^2$  و t و نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. در ابتدا، خصوصیات توصیفی بیماران به صورت درصد تعیین گردید. جمعیت هر کدام از شهرستان‌های استان در سال ۱۳۹۱ در نظر گرفته شد و میزان‌های بروز به تفکیک برای هر شهرستان به ازای هر صد هزار نفر جمعیت در معرض خطر محاسبه و ارایه گردید.

### یافته‌ها

در طی سال ۱۳۹۱، تعداد ۵۷۵ مورد جدید و یا عود بیماری تب مالت در استان اصفهان گزارش شده بود

هزار نفر بود. همچنین، کمترین بروز در شهرستان خور و بیابانک صفر، در اصفهان با میزان بروز ۱/۱۶ و برخوار با میزان بروز ۲/۷۷ در صد هزار نفر بود (جدول ۱ و شکل ۲).



شکل ۱. توزیع سنی موارد بروز بیماری تب مالت در استان اصفهان در طی سال ۱۳۹۱

بیماران روستایی برابر  $17/21 \pm 36/04$  سال بود که اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی دار بود ( $P = 0/040$ ). توزیع سنی بیماران در شکل ۱ ارایه شده است.

میزان بروز بیماری در استان اصفهان در طی سال ۱۳۹۱ برابر با ۱۳/۱۱ در هر صد هزار نفر بود. این میزان در زنان برابر با ۴/۱۵ و در مردان ۹/۶۴ در صد هزار نفر بود. این میزان در مناطق شهری و در مناطق روستایی ۱۲/۰۹ در هر صد هزار نفر بود. در بررسی میزان بروز بر اساس شغل، بیشترین میزان بروز در زنان خانه‌دار و کمترین میزان در کودکان بود.

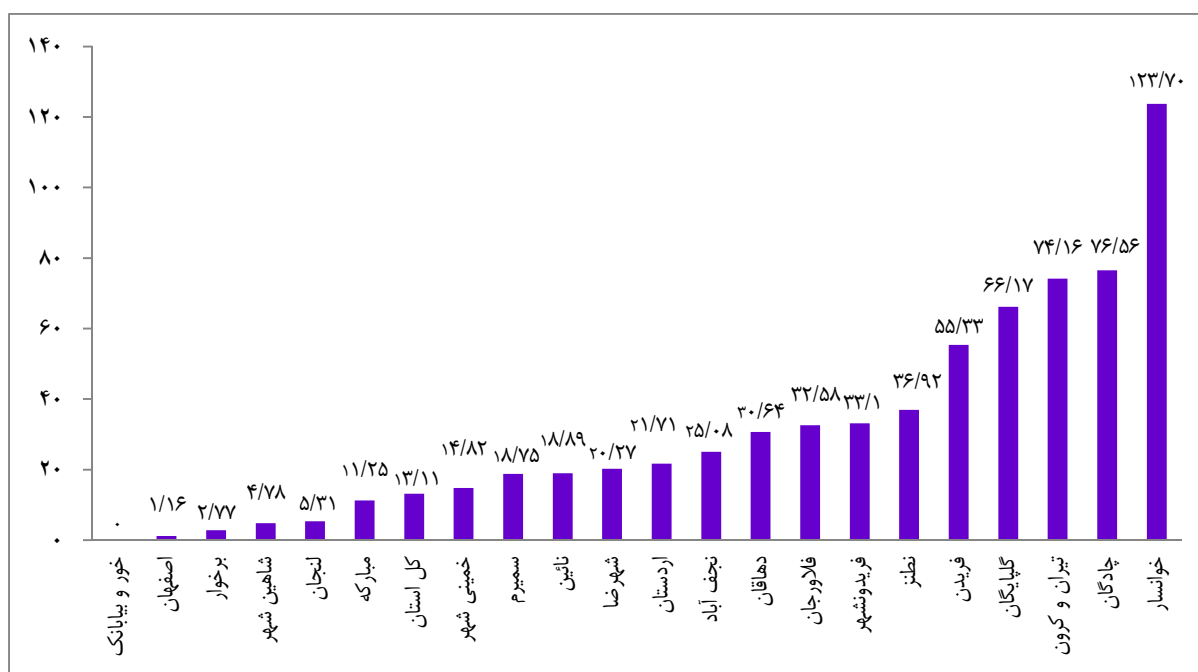
بیشترین بروز بیماری به ترتیب در شهرستان خوانسار با میزان بروز ۱۲۳/۷، چادگان با میزان بروز ۷۶/۵۶ و تیران و کرون با میزان بروز ۷۴/۱۶ در صد

جدول ۱. توزیع بروز بیماری تب مالت در شهرستان‌های استان اصفهان به ازای صد هزار نفر جمعیت در معرض خطر در سال ۱۳۹۱

شهرستان	تعداد موارد در سال ۱۳۹۱	جمعیت در سال ۱۳۹۱	میزان بروز در صد هزار نفر	خطر نسبی
۱ اردستان	۹	۴۱۴۶۵	۲۱/۷۱	۱/۶۵
۲ برخوار	۳	۱۰۸۱۷۴	۲/۷۷	۰/۲۱
۳ چادگان	۲۷	۳۵۲۶۷	۷۶/۵۶	۵/۸۳
۴ دهاقان	۱۱	۳۵۸۹۶	۳۰/۶۴	۲/۳۳
۵ اصفهان	۲۵	۲۱۴۶۹۷۸	۱/۱۶	۰/۰۸
۶ فلاورجان	۷۵	۲۳۰۲۰۶	۳۲/۵۸	۲/۴۸
۷ فریدن	۴۶	۸۳۱۴۰	۵۵/۳۳	۴/۲۲
۸ فریدونشهر	۱۳	۳۹۲۷۹	۳۳/۱۰	۲/۵۲
۹ گلپایگان	۵۴	۸۱۶۱۰	۶۶/۱۷	۵/۰۴
۱۰ خوانسار	۳۸	۳۰۷۲۰	۱۲۳/۷۰	۹/۴۳
۱۱ خمینی شهر	۴۵	۳۰۳۷۲۰	۱۴/۸۲	۱/۱۳
۱۲ لنجان	۱۳	۲۴۵۰۳۵	۵/۳۱	۰/۴۰
۱۳ مبارکه	۱۵	۱۳۳۳۷۳	۱۱/۲۵	۰/۸۵
۱۴ نائین	۷	۳۶۸۷۶	۱۸/۹۸	۱/۴۴
۱۵ نجف‌آباد	۷۷	۳۰۷۰۰۷	۲۵/۰۸	۱/۹۱
۱۶ نطنز	۱۵	۴۰۶۳۱	۳۶/۹۲	۲/۸۱
۱۷ سمیرم	۱۳	۶۹۳۴۴	۱۸/۷۵	۱/۴۳
۱۸ شهرضا	۲۹	۱۴۳۰۵۱	۲۰/۲۷	۱/۵۴
۱۹ شاهین شهر	۹	۱۸۸۱۰۳	۴/۷۸	۰/۳۶
۲۰ تیران و کرون	۵۱	۶۸۷۶۸	۷۴/۱۶	۵/۶۵
۲۱ خور و بیابانک	۰	۱۷۹۲۷	۰	-
۲۲ کل استان	۵۷۵	۴۳۸۶۵۷۰	۱۳/۱۱	۱/۰۰

در بررسی ارتباط بین نوع بیماری (مورد جدید و یا عود) با شهرستان محل سکونت و سابقه‌ی تماس با دام، ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0/050$ ). بین نوع بیماری با گروه‌های سنی، جنسیت، سابقه‌ی بستری در بیمارستان، شهرستان محل سکونت، شغل، ابتلای سایر افراد خانوار، مصرف لبنیات، سابقه‌ی تماس با دام، تحصیلات و منطقه‌ی سکونت (شهری و روستایی) ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/050$ ).

بیشترین بروز بیماری در فصل بهار و کمترین میزان آن در فصل زمستان بود. بیماری در نیمه‌ی اول سال بیشتر از نیمه‌ی دوم سال بود؛ به گونه‌ای که ۶۹/۲۱ درصد از موارد بیماری طی شش ماهه‌ی اول سال رخ داده بود. تعداد و میزان بروز بر اساس هر فصل از سال در جدول ۲ قابل مشاهده است. همچنین، در شکل ۳، توزیع بیماری تب مالت بر اساس ماه تشخیص بیماری ارایه شده است.

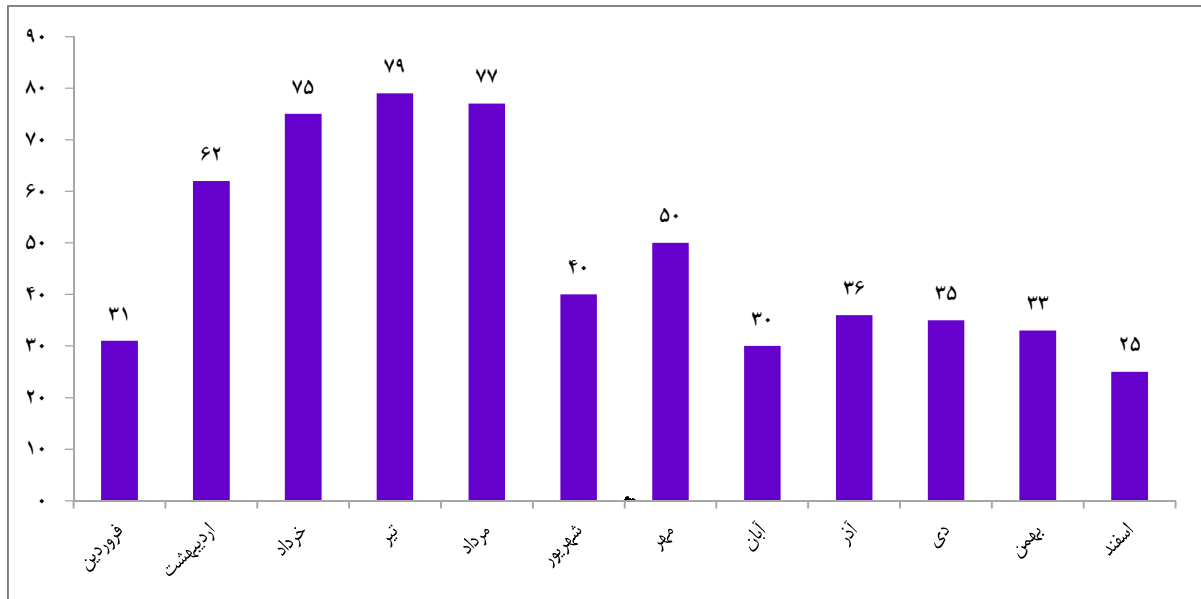


شکل ۲. میزان بروز بیماری تب مالت در استان اصفهان طی سال ۱۳۹۱ (میزان در صد هزار نفر جمعیت در معرض خطر)

جدول ۲. توزیع بروز بیماری تب مالت بر اساس فصل در استان اصفهان در سال ۱۳۹۱

فصل	فراوانی	میزان بروز در هر صد هزار نفر	خطر نسبی
بهار	۲۱۵	۲۰/۶۴	۲/۵۲
تابستان	۱۸۳	۱۷/۵۶	۲/۱۵
پاییز	۹۲	۸/۸۳	۱/۰۲
زمستان	۸۵	۸/۱۶	۱/۰۰





شکل ۳. توزیع بیماری تب مالت بر اساس ماه تشخیص بیماری در استان اصفهان طی سال ۱۳۹۱

که در مطالعه‌ی الماسی حشیانی و همکاران در سال ۱۳۹۱-۹۲ در استان اراک بر روی بیماری بروسلوز، نیز مشاهده شد که مردان نسبت بیشتری از بیماران را در بر می‌گیرند (۱۴). همچنین، مطالعه‌ی Elbeltagy در کشور عربستان سعودی نیز نتایج مشابهی داشت (۱۵). در حالی که در مطالعه‌ای که در بیمارستان امام خمینی (ره) و سینای تهران توسط حدادی و همکاران انجام شد، مشاهده گردید که بیماری بروسلوز در زنان بیشتر از مردان می‌باشد (۱۶).

بیماری بروسلوز به عنوان یک بیماری شغلی که در مردان بیشتر رخ می‌دهد، شناسایی شده است، اما با توجه به این که در برخی مناطق زنان هم پا به پای مردان در مشاغل همچون کشاورزی و دامداری مشغولند، بنا بر این بروسلوز حتی به عنوان یک بیماری شغلی، به طور الزامی خاص مردان نیست. در برخی از مطالعات، از آن جایی که زنان نیز همانند مردان در مشاغل همچون کشاورزی و دامداری مشغول می‌باشند، بروز بیماری در آن‌ها نیز مشابه

## بحث

برای کنترل، پیش‌گیری و یا حذف بیماری بروسلوز همانند هر بیماری دیگری نیاز به داشتن سیاست‌های درست و داده‌های اپیدمیولوژیک به روشنی احساس می‌گردد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، میزان بروز بیماری در استان اصفهان ۱۳/۱۱ در هر صد هزار نفر جمعیت در طی سال ۱۳۹۱ بود. بر این اساس، استان اصفهان جزء مناطق با بروز بسیار کم (بروز ۰-۳۰ در هر صد هزار نفر جمعیت در سال) طبقه‌بندی می‌شود. فراهانی و همکاران در مطالعه‌ای که در شهرستان اراک انجام داده بودند، متوسط میزان بروز بروسلوز را ۶۰ در هر صد هزار نفر جمعیت در طول سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۹۱ برآورد نمودند.

در این مطالعه، مردان نسبت بیشتری از بیماران را تشکیل می‌دادند؛ به گونه‌ای که ۶۹/۹ درصد از بیماران را مردان و ۳۰/۱ درصد از آن‌ها را زنان تشکیل می‌دادند (۱۳). این نتیجه، با نتایج تعدادی از مطالعات دیگر در این زمینه مشابهت دارد؛ به طوری

مردان است. با این حال، با توجه به این که در استان اصفهان بروز بیماری در مردان بیشتر از زنان می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که بیماری در این منطقه از کشور، بیشتر به صورت شغلی مشاهده می‌شود.

در این مطالعه مشاهده شد که بیماری در فصل‌های بهار و تابستان که فصل زایش دام‌ها می‌باشد، شایع‌تر است که با سایر مطالعات در این زمینه مطابقت دارد (۱۷-۱۸). می‌توان عنوان کرد که در فصل بهار و تابستان به علت تماس با بقایای آبستنی سقط شده و امثال آن و همچنین استفاده از فراورده‌های لبنی آلوده، این بیماری به نسبت بیشتری نسبت به پاییز و زمستان رخ می‌دهد. به طور کلی، شیوع فصلی بیماری در نیمه اول سال شایع‌تر از نیمه دوم سال بوده است؛ به این صورت که افزایش موارد بیماری از فروردین شروع شده و تا مرداد و شهریور ادامه داشته؛ سپس از مهر تا اسفند کاهش یافته است. از این رو، مؤثرترین زمان ممکن جهت اجرای برنامه‌های مداخله‌ای و پیش‌گیری، قبل از شروع فصل شیوع یعنی طی ماه‌های پایان سال است و زمان اصلی جهت پی‌گیری بیماران باید در فصل بهار و تابستان در نظر گرفته شود.

در مطالعه حاضر، میانگین سنی بیماران ۳۶ سال بود که با نتایج تعدادی از مطالعات مشابهت دارد (۱۶، ۱۴). با توجه به فعال بودن این گروه سنی از لحاظ اقتصادی و اجتماعی، اهمیت مبارزه با این بیماری بیشتر مشخص می‌گردد. همچنین، ۸۷/۷ درصد از بیماران ساکن مناطق روستایی بودند. بیشتر بودن نسبت رخداد بیماری در مناطق روستایی، در تعدادی از مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است (۱۳، ۱۴، ۳).

در مطالعه‌ای که توسط مصطفوی و آسمند انجام شده است، میانگین بروز گزارش شده‌ی سالیانه‌ی بیماری در کشور، ۴۳/۲۴ در صد هزار نفر بوده است و روند بروز بیماری در سالیان تحت مطالعه، روندی رو به کاهش بوده است. در مطالعه‌ی مصطفوی و آسمند، کشور ایران از نظر میزان بروز بیماری به ۶ دسته از آلودگی بسیار شدید تا آلودگی بسیار کم تقسیم‌بندی شده است، که در این بین، استان اصفهان جزء استان‌های با آلودگی بسیار کم (میزان بروز بین ۰-۳۰ در هر صد هزار نفر) طبقه‌بندی شده است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز این یافته را تأیید می‌کند؛ به گونه‌ای که در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان بروز محاسبه شده ۱۳/۱۱ در صد هزار نفر می‌باشد که نشان دهنده‌ی این است که در سال ۱۳۹۱ نیز استان اصفهان جز استان‌های با آلودگی بسیار کم طبقه‌بندی می‌شود (۱۰). همان‌طور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، بیشترین بروز بیماری به ترتیب در شهرستان خوانسار ۱۲۳/۷، چادگان ۷۶/۵۶ و تیران و کرون ۷۴/۱۶ در صد هزار نفر می‌باشد. همچنین، کمترین بروز در شهرستان خور و بیابانک صفر، اصفهان ۱/۱۶ و برخوار ۲/۷۷ در صد هزار نفر می‌باشد که نشان دهنده‌ی اختلاف در توزیع جغرافیایی بیماری در سطح استان است.

احتمال می‌رود یکی از دلایل مهم که منجر به مشاهده‌ی اختلاف جغرافیایی بروز بیماری در سطح شهرستان‌های استان اصفهان شده است، نسبت متفاوت جمعیت شهری و روستایی در هر شهرستان می‌باشد؛ به گونه‌ای که نسبت جمعیت روستایی در شهرستان‌های خوانسار، چادگان و تیران و کرون بیشتر از شهرستان اصفهان می‌باشد. همچنین، دلیل

دیگری که می‌تواند در این اختلاف مؤثر باشد، حساسیت متفاوت شهرستان‌های استان در خصوص نظام مراقبت و گزارش‌دهی بیماری‌ها است؛ به طوری که اگر شهرستانی در این خصوص فعالیت بیشتری انجام داده باشد، تعداد بیشتری از موارد را نیز کشف و گزارش‌دهی می‌نماید. از طرفی، با توجه به این که دام‌ها به عنوان مخازن بیماری بروسلوز شناسایی می‌شوند، در صورتی که در هر شهرستان تعداد رأس دام بیشتری حضور داشته باشد، یا نسبت بیشتری از شغل افراد آمیخته با نگهداری دام باشد و یا شیوع استفاده از محصولات لبنی سنتی در آن شهرستان بیشتر باشد، انتظار می‌رود که اختلاف در توزیع جغرافیایی بین شهرستان‌های استان مشاهده شود. با توجه به این که حدود ۹۰ درصد از موارد بروز بیماری در مناطق روستایی مشاهده شده است، می‌توان به ارتباط این عوامل با سکونت در مناطق روستایی پی برد.

از طرفی، تجارب کشورهای نظیر پرتغال که توانسته‌اند بیماری را ریشه‌کن نمایند، نشان دهنده‌ی این مطلب می‌باشد که می‌توان با به کارگیری یک برنامه‌ی منظم آزمایش و کشتار دام‌ها و واکسیناسیون آن‌ها، ضمن کنترل بیماری، آن را حتی ریشه‌کن نیز نمود (۱۹).

سازمان جهانی بهداشت، واکسیناسیون دام‌ها را تنها روش مناسب برای کنترل عفونت بروسلوز دانسته است که باید اولین گام در جهت حذف بیماری در نظر گرفته شود (۲۰). شایان ذکر است که پیش‌گیری از ابتلا به این بیماری در انسان، به دو طریق پیش‌گیری از تماس با دام آلوده و عدم مصرف فراورده‌های دامی آلوده قابل انجام است (۲۱). به

طور کلی و بر اساس یک معیار جهانی، میزان شیوع بروسلوز در هر کشوری بستگی بسیار نزدیکی با میزان شیوع بیماری در دام‌های آن کشور دارد (۲۲). در ایران نیز در طی مطالعه‌ای مشاهده شد که بیماری در استان‌های غربی و شمال غربی، که دارای تراکم گوسفندی بیشتری هستند، بیشتر گزارش شده است (۱۰). این امر نشان دهنده‌ی اهمیت انجام برنامه‌های پیش‌گیری و درمانی و فعال‌تر شدن برنامه‌های ادارات دام‌پزشکی به خصوص در شهرستان‌هایی می‌باشد که بروز بیماری در آن‌ها، بالاتر از متوسط استانی است.

در بسیاری از کشورهای توسعه یافته، بیماری بروسلوز در گاوها ریشه‌کن شده است یا در مرحله‌ی ریشه‌کنی می‌باشد، اما این بیماری هنوز در بسیاری از کشورهای جهان، به خصوص کشورهای در حال توسعه شایع می‌باشد. بروسلا ملی تنسیس نیز در کشورهای که برنامه‌ریزی دقیق و امکانات مناسب دام‌پزشکی به کمک بهداشت عمومی آمده است، مثل آمریکا، کانادا، کشورهای اروپای شمالی، استرالیا و نیوزلند ریشه‌کن شده است (۲۳). گرچه راه‌کارهای مختلفی برای کنترل بیماری تب مالت انسانی در دنیا به کار رفته است، اما به طور تقریبی، همه‌ی آن‌ها بر اساس فعالیت‌های دام‌پزشکی استوار است. کشورهای نظیر پرتغال در ریشه‌کنی بروسلوز، تجارب موفق‌ی داشته‌اند که نشان دهنده‌ی آن است که با برنامه‌ی منظم آزمایش و کشتار دام‌ها و واکسیناسیون آن‌ها می‌توان ضمن کنترل بیماری در انسان و دام، آن را حتی ریشه‌کن نیز نمود (۱۹).

در مطالعات روند بیماری در کشورهای مختلف نظیر عربستان سعودی، مکزیک و ایتالیا نیز تأثیر واکسیناسیون دامی بر کاهش موارد گزارش شده‌ی

انسانی نشان داده شده است (۲۴-۲۶).

در ایران همه ساله موارد زیادی از بیماری تب مالت گزارش می‌گردد. علت گسترش این بیماری در کشور را می‌توان ناشی از وجود مرزهای طولانی کشور با کشورهای همسایه و عدم نظارت بر واردات دام، تعداد زیاد جمعیت عشایر، روش‌های سنتی دامداری، زندگی و تماس مستقیم روستاییان با دام‌ها، عدم نظارت کافی بر تولید و توزیع فراورده‌های دامی و محصولات لبنی و عدم اجرای منظم واکسیناسیون و آزمایش و کشتار دام‌ها و همچنین، عدم اجرای قرنطینه‌ی دامی به طور مناسب و کامل و نیز خشک‌سالی و کاهش پوشش گیاهی دانست (۲۷، ۱۱، ۱).

محدودیت این مطالعه این است که تنها بیمارانی که پس از ابتلا به بیماری جهت دریافت خدمات درمانی به مراکز بهداشتی و درمانی، مطب‌ها و آزمایشگاه‌های دولتی و خصوصی موجود در هر شهرستان مراجعه نموده‌اند، در نظر گرفته شدند. بنا بر این، به علت عدم وجود اطلاعات بیمارانی که جهت درمان خود اقدامی ننموده یا جهت دریافت خدمات درمانی به استان‌های مجاور مراجعه نموده‌اند، این بیماران وارد مطالعه نشدند.

نتیجه‌گیری نهایی این که میانگین میزان بروز تب مالت در استان اصفهان کمتر از متوسط کشوری می‌باشد و این استان جزء استان‌های با بروز بسیار کم (۳۰-۰ در صد هزار نفر در سال) طبقه‌بندی می‌شود. این بیماری در مناطق روستایی بسیار شایع‌تر از مناطق شهری می‌باشد. بنا بر این، اقدامات آموزشی، پیش‌گیری و درمانی در مناطق روستایی و به خصوص افراد با گروه شغلی دامدار و خانه‌دار دارای اولویت بیشتری نسبت به مناطق شهری است. همچنین، اختلاف در توزیع جغرافیایی بیماری در سطح شهرستان‌های استان اصفهان بارز می‌باشد. با توجه به حضور بهورزان در خانه‌های بهداشت در مناطق روستایی، می‌توان از خدمات ایشان در برگزاری مداخلات آموزشی استفاده‌ی بیشتری نمود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری و مساعدت تمامی پرسنل مراکز بهداشت شهرستان‌های استان اصفهان به ویژه پرسنل واحد مبارزه با بیماری‌های این استان تقدیر و تشکر می‌گردد.

### References

1. Azizi F, Janghorbani M, Hatami H. Epidemiology and control of common disorders in Iran. Tehran, Iran: Eshtiagh; 2000. p. 665-72. [In Persian].
2. Smits HL, Kadri SM. Brucellosis in India: a deceptive infectious disease. Indian J Med Res 2005; 122(5): 375-84.
3. Ghasemi B, Mohammadia B, Soofimajidpour M. Epidemiology of human and animal brucellosis in Kurdistan Province in 1997-2001. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2015; 23-32. [In Persian].
4. Van Dong H, Lee AH, Nga NH, Quang N, Le Chuyen V, Binns CW. Epidemiology and prevention of prostate cancer in Vietnam. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(22): 9747-51.
5. Long SS, Pickering LK, Prober CG. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2008.
6. Haran M, Agarwal A, Kupfer Y, Seneviratne C, Chawla K, Tessler S. Brucellosis presenting as septic shock. BMJ Case Rep 2011; 2011.
7. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 2006; 6(2): 91-9.

8. Ramin B, Macpherson P. Human brucellosis. *BMJ* 2010; 341: c4545.
9. Roya N, Abbas B. Colorectal cancer trends in Kerman province, the largest province in Iran, with forecasting until 2016. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(2): 791-3.
10. Mostafavi E, Asmand M. Trend of brucellosis in Iran from 1991 to 2008. *Iran J Epidemiol* 2012; 8(1): 94-101. [In Persian].
11. Makarem EH, Karjoo R, Omidi A. Frequency of *Brucella melitensis* in Southern Iran. *J Trop Pediatr* 1982; 228(2): 97-100.
12. Sauret JM, Vilissova N. Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract* 2002; 15(5): 401-6.
13. Farahani Sh, Shah Mohamadi S, Navidi I, Sofian M. An investigation of the epidemiology of brucellosis in Arak City, Iran, (2001-2010). *J Arak Univ Med Sci* 2012; 14(7): 49-54. [In Persian].
14. Almasi-Hashiani A, Khodayari M, Eshrati B, Shamsi M. Factors affecting the interval between the onset and diagnosis of brucellosis in Markazi Province, Iran (2010-11). *J Arak Univ Med Sci* 2012; 14(7): 21-30. [In Persian].
15. Elbeltagy KE. An epidemiological profile of brucellosis in Tabuk Province, Saudi Arabia. *East Mediterr Health J* 2001; 7(4-5): 791-8.
16. Haddadi A, Rasoulinejad M, Afhami S, Mohraz M. Epidemiological, clinical, para clinical aspects of brucellosis in Imam Khomeini and Sina Hospital of Tehran (1998-2005). *Behbood J* 2006; 10(3): 242-51. [In Persian].
17. Tohme A, Hammoud A, El Rassi B, Germanos-Haddad M, Ghayad E. Human brucellosis. Retrospective studies of 63 cases in Lebanon. *Presse Med* 2001; 30(27): 1339-43.
18. Mousa ARM, Elhag KM, Khogali M, Marafie AA. The nature of human brucellosis in Kuwait: Study of 379 cases. *Rev Infect Dis* 1988; 10(1): 211-7.
19. Martins H, Garin-Bastuji B, Lima F, Flor L, Pina FA, Boinas F. Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal-Outcome of a 5-year programme (2002-2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. *Prev Vet Med* 2009; 90(1-2): 80-9.
20. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. 6<sup>th</sup> Report. Geneva, Switzerland: WHO; 1986.
21. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 2012; 61(6): 1079-92.
22. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 2010; 140(3-4): 392-8.
23. Blasco JM. Control and eradication strategies for *brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Prilozi* 2010; 31(1): 145-65.
24. Eldeib A, Shallik N, Elrashidy A, Elsheikh H, Zaki M. Brucellosis trend and effect of domestic livestock vaccination on disease Incidence in human. *Tanta Med Sc J* 2008; 3: 7-18.
25. Luna-Martinez JE, Mejia-Teran C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol* 2002; 90(1-4): 19-30.
26. Picciotto D, Verso MG, Lacca G, Mangiapane N, Caracappa S, Vitale F, et al. [The epidemiological trend of brucellosis in the provinces of Sicily]. *Med Lav* 1999; 90(6): 786-90.
27. Sofian M, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A. Risk factors for human brucellosis in Iran: a case-control study. *Int J Infect Dis* 2008; 12(2): 157-61..

## Epidemiological Characteristics and Incidence Rate of Brucellosis in Isfahan Province, Iran, 2012

Mahdi Mohammadian<sup>1</sup>, Hamid Salehiniya<sup>2</sup>, Salman Kazaei<sup>3</sup>, Javad Ramazanpour<sup>4</sup>,  
Abdollah Mohammadian-Hafshejani<sup>5</sup>

### Short Communication

#### Abstract

**Background:** Brucellosis is a common zoonotic disease, which spread from infected animals to humans. This study aimed to determine the epidemiological characteristics and incidence rate of brucellosis during 2012 in Isfahan province, Iran.

**Methods:** This cross-sectional study assessed all the patients with diagnosis of brucellosis in Isfahan province during 2012. We used t and chi-square test for data analysis. The incidence rate was calculated based on per 100'000 of at-risk population.

**Findings:** Totally, 575 patients with brucellosis were identified of which, 69.9% were men and 87.7% were from rural areas. Housewives-ranchers and children were the most and least at-risk individuals, respectively. The incidence of the disease was 11.13 per 100'000 of at-risk population in the province, 4.15 in male, 9.64 in women, 1.7 in urban areas and 12.9 per 100'000 of at-risk population ear in rural areas during 2012. In addition, there was significant association between the type of disease (new or recurrent) and county of residence and history of contact with animals ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The incidence of brucellosis in the Isfahan province was less than the national average, and this province classified to have very low incidence. In addition, there were clear differences in the geographical distribution of disease in the province.

**Keywords:** Brucellosis, Incidence, Epidemiology, Iran

**Citation:** Mohammadian M, Salehiniya H, Kazaei S, Ramazanpour J, Mohammadian-Hafshejani A. **Epidemiological Characteristics and Incidence Rate of Brucellosis in Isfahan Province, Iran, 2012** J Isfahan Med Sch 2015; 33(355): 1784-95

1- Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Researcher, Minimally Invasive Surgery Research Center, Iran University of Medical Sciences AND PhD Student, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- PhD Student, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

4- Deputy of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Epidemiologist, Department of Social Medicine, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan AND PhD Candidate, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Abdollah Mohammadian-Hafshejani, Email: a\_mohamadii@yahoo.com

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

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

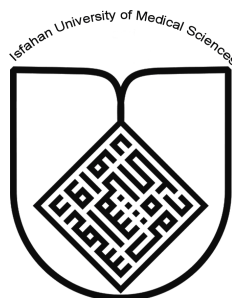
## INSTRUCTION TO AUTHORS

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



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

1. **Mojtaba Abtahi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada
3. **Mohammad Esmail Akbari** MD, Professor of Thoracic Surgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. **Reza Amin** MD, Professor of Pediatrics, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. **Babak Amra** MD, Professor of Pulmonology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6. **Saeid Andalib Jortani** MD, Professor of Pathology, Lewis Weil University, USA
7. **Gholam Reza Askari** MD, PhD of Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
8. **Reza Bagherian-Sararoudi** PhD, Assistant Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
9. **Majid Berekatain** MD, Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
10. **Ken Bassett** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
11. **Ahmad Chitsaz** MD, Associate Professor of Neurology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
12. **Afsoon Emami** MD, Associate Professor of Nephrology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
13. **Ali Reza Emami** MD, Associate Professor of Infectious Diseases, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
14. **Shahin Emami** Biochemistry and Endocrinology, Saint Antoine Hospital, France
15. **Ebrahim Esfandiary** MD, PhD, Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
16. **Faramarz Esmail beigi** MD, Professor of Internal Medicine, School of Medicine, USA
17. **Ziba Farajzadegan** MD, Associate Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
18. **Hamid Fesharaki** Associate Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Marjane Foladi** PhD of Nursing, University of Florida, USA
20. **Aziz Gahari** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
21. **Ali Gheisari** MD, Professor of Cardiovascular Surgery, California, USA
22. **Jafar Golshahi** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
23. **Ali Mohammad Hanjani** MD, Professor of Cardiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
24. **Mina Hasanrezaei** MD, NeuroImmunology, School of Pharmacy, USA
25. **Saied Morteza Heidari** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
26. **Mansour karamooz** MD, Professor of Urology, California, USA
27. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
28. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics & Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
29. **Majid Khazaei** MD, PhD, Associate Professor of Medical Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
30. **Parvin Mahzooni** MD, Associate Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
31. **Majid Maleki** MD, Professor of Cardiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
32. **Mohammad Mardani** MD, Associate Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
33. **Atiye Moghisi** MD, Professor of Endocrinology, Endocrine and Metabolism Research Center, USA
34. **Mehdi Modares** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
35. **Hoshang Moein** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
36. **Fereydoun Nouhi** MD, Professor of Cardiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
37. **Mohammadreza Nourbakhsh** Associate Professor of Physiotherapy, USA
38. **Farzin Pourfarzad** Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands
39. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
40. **Hassan 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. 355, 3<sup>rd</sup> Week, December 2015

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

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

---

### Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

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

### Office:

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

Telefax: +98 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.