

### مقاله های پژوهشی

- ۱۲۳۹ ... بررسی تأثیر استروژن بر میزان بیان نشانگرهای عصبی در طی تمایز نورونیک سلول های بنیادی مشتق از چربی ...  
 دکتر شهناز رضوی، نفیسه احمدی، محمد کاظمی، حمیدرضا صادقیان
- ۱۲۵۰ ... بررسی اثرات گیرنده ی ۳-T-Cell Immunoglobulin Mucin (TIM-3) در مهار تکثیر رده های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) ...  
 نرگس زرگر بالا جمع، دکتر مهدی شعبانی، منصوره حقیقی، احمد علی بیات، دکتر محمود آقائی
- ۱۲۶۱ ... بررسی سرمی عوامل عفونی منتقل شونده از راه خون در داوطلبین اهدای خون با عوامل خطر کوچک در سازمان انتقال خون استان تهران: یک مطالعه ی هم گروهی ...  
 دکتر سید محمد میررضایی، دکتر حمید رضا صابر، دکتر فاطمه نادعلی، علی عباسیان، دکتر بشیر حاجی بیگی، دکتر سید روح اله میررضایی
- ۱۲۷۲ ... بررسی تأثیر تفاوت زمان اثردهی داروی دوستاگل در افزایش میزان مرگ سلول های تومور پستان رده ی MCF-7 در محیط برون تنی ...  
 علی ابراهیمی فرد، دکتر محمدباقر توکلی، دکتر حسین صالحی، دکتر حمید امامی

### مقاله کوتاه

- ۱۲۸۱ ... بررسی فراوانی نسبی عوارض زودرس ایجاد شده پس از عمل کوله سیستکتومی لاپاروسکوپیک در بیمارستان آموزشی آلزهای (س) اصفهان (۱۳۸۸-۹۰) ...  
 دکتر بهروز کلیدری، حسن دهقان بناد کوکی، مهدی خزایی، دکتر شهاب شهابی شاهمیری

### Original Articles

- Effects of Estrogen on the Expression of Neural Markers in Differentiated Adipose-Derived Stem Cells ..... 1249  
 Shahnaz Razavi PhD, Nafiseh Ahmadi MSc, Mohammad Kazemi MSc, amid Reza Sadeghian
- Evaluating T-Cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3) Receptor in the Growth Inhibition of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cell Lines ..... 1260  
 Narges Zargar-Balajam, Mahdi Shabani PhD, Mansoreh Haghghi MSc, Ahmad Ali Bayat MSc, Mahmoud Aghaei PhD
- Exposure with Minor Risk Factors among Blood Donors in Tehran Province, Iran: A Cohort Study ... 1271  
 Seyed Mohammad Mirrezaie MD, Hamid Reza Saber MD, Fatemeh Nadali PhD, Ali Abbasian BSc, Bashir Hajibeigi MD, Seyed Roohallah Mirrezaie MD
- Investigation the Effect of the Exposure Time of Docetaxel on MCF-7 Cell Line: An In-Vitro Assessment ..... 1280  
 Ali Ebrahimifard, Mohammad Bagher Tavakoli PhD, Hosein Salehi PhD, Hamid Imami MD

### Short Communication

- Frequency of Complications Following Laparoscopic Cholecystectomy in Alzahra Teaching Hospital, Isfahan, Iran (2009-2011) ..... 1289  
 Behrooz Kaleidari MD, Hassan Dehghan-Banadkuki, Mehdi Khazaei2, Shahab Shahabi-Shahmiri MD



# مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۴۵)، بهمنه اول 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](mailto: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](mailto: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](mailto:f.radandish@gmail.com)

[www.farzaneganco.ir](http://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](http://www.sid.ir))
- [www.iranmedex.com](http://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 گه‌ری	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	دانشیار، فوق تخصص آسیب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	دانشیار، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر هوشنگ معین	استاد، متخصص جراحی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۰- دکتر آتیه مغیثی	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 دست‌نوشته (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

- ۱۲۳۹..... بررسی تأثیر استروژن بر میزان بیان نشانگرهای عصبی در طی تمایز نوروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی.....  
دکتر شهناز رضوی، نفیسه احمدی، محمد کاظمی، حمیدرضا صادقیان
- ۱۲۵۰..... بررسی اثرات گیرنده‌ی ۳-T-Cell Immunoglobulin Mucin (TIM-۳) در مهار تکثیر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL).....  
نرگس زرگر بالا جمع، دکتر مهدی شعبانی، منصوره حقیقی، احمد علی بیات، دکتر محمود آقایی
- ۱۲۶۱..... بررسی سرمی عوامل عفونی منتقل شونده از راه خون در داوطلبین اهدای خون با عوامل خطر کوچک در سازمان انتقال خون استان تهران:  
یک مطالعه‌ی هم‌گروهی.....  
دکتر سید محمد میرضایی، دکتر حمید رضا صابر، دکتر فاطمه نادعلی، علی عباسیان، دکتر بشیر حاجی بیگی، دکتر سید روح اله میرضایی
- ۱۲۷۲..... بررسی تأثیر تفاوت زمان اثردهی داروی دوستاکسل در افزایش میزان مرگ سلول‌های تومور پستان رده‌ی ۷-MCF در محیط برون‌تنی.....  
علی ابراهیمی فرد، دکتر محمدباقر توکلی، دکتر حسین صالحی، دکتر حمید امامی

### مقاله کوتاه

- ۱۲۸۱..... بررسی فراوانی نسبی عوارض زودرس ایجاد شده پس از عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپی در بیمارستان آموزشی الزهراء (س) اصفهان (۹۰-۱۳۸۸).....  
دکتر بهروز کلیدری، حسن دهقان بنادکوک، مهدی خزایی، دکتر شهاب شهابی شاهمیری

## بررسی تأثیر استروژن بر میزان بیان نشانگرهای عصبی در طی تمایز نوروزنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی

دکتر شهناز رضوی<sup>۱</sup>، نفیسه احمدی<sup>۲</sup>، محمد کاظمی<sup>۳</sup>، حمیدرضا صادقیان<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** با توجه به سهولت دستیابی به سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی نسبت به سایر منابع سلول‌های بنیادی در صورتی که بتوان از عوامل رشد مانند استروژن جهت افزایش تمایز نرونی استفاده نمود، نرون‌های تمایز یافته، در پیوند اتولوگ بیماری‌های عصبی دژنراتیو خاص مانند بیماری پارکینسون و ضایعات نخاعی استفاده‌ی وسیعی دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر استروژن بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از طریق ارزیابی بیان نشانگر نرون بالغ (MAP2 یا Microtubule-associated protein<sub>2</sub>)، نشانگر سلول‌های گلیال (Glial fibrillary acidic protein یا GFAP) و نشانگر سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Nestin) بود.

**روش‌ها:** پس از جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی، القای عصبی سلول‌های بنیادی از طریق روش تشکیل نروسفر انجام شد. پس از یک هفته، تجمعات سلولی نروسفر تشکیل شده جهت تمایز نهایی، به محیط کشت القای عصب منتقل شد و در گروه تیمار استروژن با دوز ۱۰ نانومول تا انتهای دوره‌ی تمایز روزانه به محیط کشت القای عصب اضافه گردید. سپس ارزیابی بیان نشانگرهای Nestin، MAP2 و GFAP در سلول‌های تمایز یافته از طریق تکنیک RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) صورت گرفت. به علاوه، آزمایش MTT (۲,۵ diphenyl tetrazolium bromide assay) جهت ارزیابی تکثیر سلولی انجام شد.

**یافته‌ها:** میانگین بیان نشانگرهای Nestin و GFAP در گروه شاهد نسبت به مورد بیشتر بود و این اختلاف میانگین، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/050$ )؛ در حالی که میزان بقای سلولی در دو گروه، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع، می‌توان دریافت استروژن سبب کاهش بیان نشانگرهای عصبی می‌شود. با این حال، جهت تعیین تأثیر استروژن بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی، پیشنهاد می‌شود این مطالعه به صورت گسترده‌تر و با استفاده از تکنیک‌های حساس‌تری بررسی گردد.

**واژگان کلیدی:** استروژن، نرون‌زایی، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، Reverse transcription polymerase chain reaction

**ارجاع:** رضوی شهناز، احمدی نفیسه، کاظمی محمد، صادقیان حمیدرضا. بررسی تأثیر استروژن بر میزان بیان نشانگرهای عصبی در طی

تمایز نوروزنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۵): ۱۲۴۹-۱۲۳۹

۱- استاد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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



## مقدمه

از مدت‌ها پیش مشخص شده است که قدرت بازسازی سیستم عصبی، بسیار اندک است و اگر چه نروژنز در سراسر دوره زندگی انسان و گونه‌های مختلف صورت می‌گیرد، اما به علت محدودیت تعداد سلول‌های بنیادی عصبی قابل دسترس در سیستم عصبی پس از تولد، به کارگیری پیوند سلول‌های بنیادی نرونی، زمینه‌ی مناسبی جهت بهبود عملکرد اعصاب در بیماری‌های نروژنراتیو و ضایعات عصبی فراهم نموده است (۱).

هم اکنون، سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان (۲) و سایر بافت‌ها (۳-۴) جداسازی می‌شوند، ظرفیت تمایز به انواع رده‌های مختلف سلولی را دارند و علاوه بر این که قابلیت تمایز به سلول‌های استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروسیت را دارند (۵)، به بافت عصبی که از مشتقات اکتودرم است (۶-۷) و همچنین، هپاتوسیت از مشتقات اندودرم، تمایز می‌یابد (۸-۹).

با توجه به مطالعات اخیر، مشخص شده است که سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی، می‌تواند یک جایگزین مناسب برای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان محسوب شود؛ چرا که این بافت، از طریق لیپوساکشن و روش‌هایی که نسبت به آسپیراسیون از مغز استخوان، کمتر تهاجمی هستند، به دست می‌آید. به علاوه، تعداد سلول‌های بنیادی استخراج شده از این بافت، نسبت به مغز استخوان بسیار بیشتر است (در بافت مغز استخوان به ازای هر ۱۰۰۰۰ سلول، یک سلول بنیادی و در بافت چربی، به ازای هر ۱۰۰ سلول، ۵-۱ سلول بنیادی) (۱۰-۱۱). افزون بر این، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت

چربی، ظرفیت تمایز به انواع رده‌ی سلول‌های مزودرمی و غیرمزودرمی را دارند و علاوه بر این که به سهولت در دسترس می‌باشند، سرعت تکثیر بالاتری نسبت به سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان دارند. بنابراین، از این بافت می‌توان به تعداد کافی سلول بنیادی استخراج و در موارد کلینیکی استفاده نمود (۱۲-۱۳).

در پژوهش‌های اخیر، محققان با به کارگیری پروتکل‌های مختلف کشت سلولی و استفاده از ترکیبات شیمیایی و غلظت مناسب عوامل رشد، توانسته‌اند تغییرات مورفولوژیک و بیان نشانگرهای عصبی را در سلول‌های تمایز یافته القا نمایند (۱۴-۱۸)، اما تعداد سلول‌های به دست آمده بسیار اندک می‌باشد و در برخی موارد، این سلول‌ها بار دیگر از حالت تمایز خارج می‌شوند (۱۹-۲۰، ۹).

در حال حاضر، مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی تشخیص و تعیین غلظت مناسب عوامل رشد القای تمایز عصبی در شرایط آزمایشگاهی *In vitro* و حفظ خصوصیات سلول‌های تمایز یافته پس از پیوند در حال انجام است. اغلب این مطالعات، بر روی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان صورت گرفته است و هنوز اطلاعات ما در زمینه‌ی سایر سلول‌های مزانشیمی اندک است.

اثرات استروژن به عنوان یک هورمون جنسی بر دستگاه تناسلی مؤنث به خوبی شناخته شده است. علاوه بر این، مشخص شده است که این هورمون در هر دو جنس به عنوان یک عامل نروتروفیک جهت تکامل سیستم عصبی ضروری است (۲۱-۲۳). استرادیول‌ها، از بدو تکامل سیستم عصبی تا هنگام بلوغ در بافت مغز مهره‌داران وجود دارند و میزان

باعث پیشبرد نروژنز به دنبال حملات ایسکمی می‌گردد (۳۳). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استروژن طی نروژنز در مراحل امبریونیک و بلوغ، همچنین هنگام ترمیم بافت عصبی به صورت یک عامل تنظیم کننده عمل می‌نماید.

از دیگر سو، مشخص شده است که در موش، E<sub>2</sub> سبب تحریک تشکیل و طولیل شدن زواید نرونی در نرون‌های کورتکس مغز کشت شده در آزمایشگاه، می‌گردد (۳۴)؛ به طوری که استرادیول (E<sub>2</sub>)، از طریق تغییر فعالیت نسخه‌برداری سبب افزایش سطح نروتروفین‌های ضروری جهت طولیل شدن زواید نرونی و تغییر شکل‌پذیری نرون‌ها می‌شود. در موش، E<sub>2</sub> سبب تحریک تولید عامل نروتروفین مشتق از سلول‌های گلیال (GDNF یا Glial cell line-derived neurotrophic factor) در نرون‌های موجود در هیپوتالاموس در حال رشد می‌گردد (۳۵).

به علاوه، E<sub>2</sub> در موشی که تخمدان آن برداشته شده است، سبب افزایش سطح عوامل رشد BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)، NGF (Nerve growth factor) و NT-3 (Neurotrophins-3) در کورتکس مغز می‌شود (۳۶). حتی برخی از محققان معتقدند، مصرف E<sub>2</sub> علاوه بر این که در بهبود یادگیری و حافظه مؤثر است، می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر سودمند باشد و در جلوگیری از حملات مغزی و سکته‌ی قلبی اهمیت دارد (۳۷-۳۹).

در سال‌های گذشته، Kang و همکاران گزارش نمودند که سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف، قابلیت تمایز به انواع سلول‌های رده‌ی مزانشیمی و نرونی را دارد و اضافه نمودن E<sub>2</sub> به محیط کشت، نه تنها تمایز

تمایز عصبی، بقا و تغییر شکل‌پذیری (Plasticity) نرون‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۶-۲۱).

شواهد موجود حاکی از آن است که استروژن، بر عملکرد سلول‌های پیش‌ساز عصبی و به طور کلی نروژنز مؤثر است؛ به طوری که در جوندگان، فعالیت آنزیم آروماتاز که در بیوستنز استروژن شرکت دارد، طی مرحله‌ی امبریونیک به حداکثر میزان خود می‌رسد (۲۷). به علاوه، مشخص شده است که در شرایط آزمایشگاه مصرف ۱۷-بتا استرادیول (E<sub>2</sub>) یا Estradiol<sub>12</sub> سبب افزایش پرولیفراسیون سلول‌های پیش‌ساز عصبی می‌گردد و در صورت بلوک نمودن گیرنده‌های استروژن، میزان پرولیفراسیون سلول‌های پیش‌ساز عصبی کاهش می‌یابد (۲۸).

در موش‌هایی که گیرنده‌ی ER<sub>2</sub> (Estrogen receptor<sub>2</sub>) مغز آن‌ها Knockout شده است، تعداد سلول‌های عصبی به خصوص در کورتکس مغز، کاهش می‌یابد (۲۹).

این گزارش‌ها نشان می‌دهد که در بدن E<sub>2</sub> طی تکامل کورتکس مغز به عنوان یک عامل پرولیفراسیون عمل می‌نماید. همچنین، از مدت‌ها قبل مشخص شده است که استروژن، می‌تواند به عنوان یک عامل حفاظت از بافت عصبی (Neuroprotective) در هنگام ترمیم آسیب‌های مغزی عمل نماید؛ به طوری که پس از ایجاد ضایعات عصبی بیان آنزیم سازنده‌ی استروژن، آروماتاز در سلول‌های آستروسیت (در رت) و سلول‌های رادیال گلیال (در پرنده‌گان) مشاهده می‌شود (۲۸، ۳۰).

طی مطالعات متعددی مشخص شده است که در اطراف نواحی ضایعات عصبی، افزایش تولید استروژن با نروژنز همراه است (۳۱-۳۲) و استرادیول

محیط کشت (DMEM (Gibco) (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) خنثی گردید. پس از سانتریفوژ و تخلیه‌ی محیط رویی، رسوب سلولی در محیط کشت حل گردید.

سوسپانسیون سلولی در فلاسک T25 حاوی DMEM و سرم در شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و  $CO_2$  ۵ درصد کشت داده شد و محیط کشت هر ۳-۴ روز یک بار تعویض گردید.

سلول‌های بنیادی در محیط پیش‌القای DMEM/F12 فاقد سرم و حاوی ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (Basic fibroblast growth factor) bFGF، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (Epidermal growth factor) EGF و ۲ B27 درصد کشت داده شد. پس از یک هفته، تجمعات سلولی نروسفر تشکیل شد، سپس جهت القا و تمایز نهایی، این سلول‌ها به محیط کشت نوروبازال منتقل شدند (به عنوان گروه شاهد). در گروه مورد، استرادیول E2 (سیگما) با دوز ۱۰ نانومول تا انتهای دوره‌ی تمایز روزانه به محیط کشت اضافه گردید.

برای ارزیابی میزان بقا و تکثیر سلولی، در کشت سلول‌های در حال تمایز که به آن استروژن اضافه شده بود، ارزیابی MTT [dimethyl thiazol-۲-yl] (۳-(۴,۵-diphenyl tetrazolium bromide assay [۲,۵] پس از تیمار استروژن در دو گروه مورد و شاهد انجام شد. سلول‌های تمایز یافته با PBS شسته شدند و آزمایش MTT انجام شد.  $10^3 \times 2$  سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه در محیط القا کاشته شدند و گروه مورد در حضور ۱۰ نانومول استروژن تمایز یافتند. پس از ۷ روز از تمایز، محیط کشت تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر

نرونی حاصل از سلول‌های بنیادی امبریونیک و سلول‌های بنیادی عصبی را افزایش می‌دهد؛ بلکه در تمایز نرونی سلول‌های بنیادی مشتق از طناب نافی نیز مؤثر است (۴۰).

با توجه به اثرات بارز استروژن بر تکامل و عملکرد عصبی و این که تاکنون تأثیر آن بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بررسی نشده است؛ از این رو، در این مطالعه تأثیر استروژن بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که تحت شرایط خاص به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابند، مورد بررسی قرار گرفت و وضعیت بیان نشانگر نوروون بـالغ (MAP2) و نشانگر سلول‌های گلیال (Glial fibrillary acidic protein) یا GFAP و Nestin (نشانگر سلول‌های پیش‌ساز عصبی) از طریق تکنیک RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) ارزیابی می‌گردد.

## روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی مطابق دستورالعمل مطالعات پیشین صورت گرفت (۴۱). پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران مراجعه کننده جهت عمل جراحی، بافت چربی زیر جلدی تهیه و سپس با PBS (Gibco) (Phosphate-buffered saline) جهت حذف بقایای سلولی و سلول‌های خونی شستشو داده شدند. در ادامه، با استفاده از تیغ تیز، تجزیه‌ی مکانیکی انجام گرفت. سپس کلاژناز نوع I (سیگما) به نمونه اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه، اثر کلاژناز با استفاده از

پرایمرهای الیگو و کیت (Fermentage) RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit استفاده شد.

بعد از ران نمودن روی ژل آگارز و مشاهده و عکس برداری باندهای نشانگرهای پیش گفته در گروه‌های مختلف، از طریق نرم‌افزار Image J با یکدیگر مقایسه می‌گردد. یافته‌های مربوط، در جدول ۱ آمده است.

### یافته‌ها

#### مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

سلول‌های بنیادی جداسازی شده از بافت چربی، به کف فلاسک چسبیده و تکثیر شدند. این سلول‌ها، مورفولوژی دوکی شکل و فیروبلست مانند داشتند (تصویر A ۱).

از سلول‌های پاساژ ۳-۵ جهت القای عصبی استفاده شد. القای تمایز عصبی در دو مرحله انجام گرفت. ابتدا با قرار دادن سلول‌های بنیادی در محیط پیش القای توده‌های کروی شکلی که در محیط به صورت شناور بودند، به نام نروسفر تشکیل شدند (تصویر B ۱).

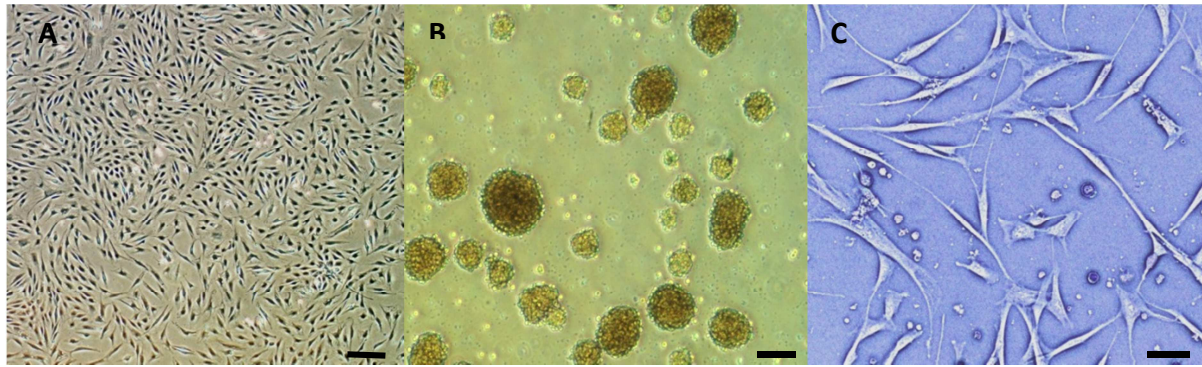
از DMEM/F۱۲ و ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محلول MTT از محیط کشت حذف شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به چاهک اضافه گردید. پس از پیتینگ، میزان جذب هر کدام از چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه، از تکنیک RT-PCR جهت بررسی بیان Nestin (نشانگر سلول‌های پیش‌ساز عصبی)، MAP۲ (نشانگر سلول‌های عصبی بالغ)، GFAP (نشانگر سلول‌های گلیال) در سلول‌های حاصل از تمایز در دو گروه مورد و شاهد استفاده شد. در این مطالعه، (Glyceraldehyde ۳-phosphate dehydrogenase) GAPDH به عنوان Housekeeping gene استفاده شد. به منظور جداسازی RNA از کیت جداسازی RNA isolation RNX plus (CinnaGen) استفاده شد. جهت سنتز cDNA (Complementary DNA) با استفاده از روند نسخه‌برداری معکوس، رشته‌ی DNA از الگوی RNA ساخته شد. بدین منظور، از

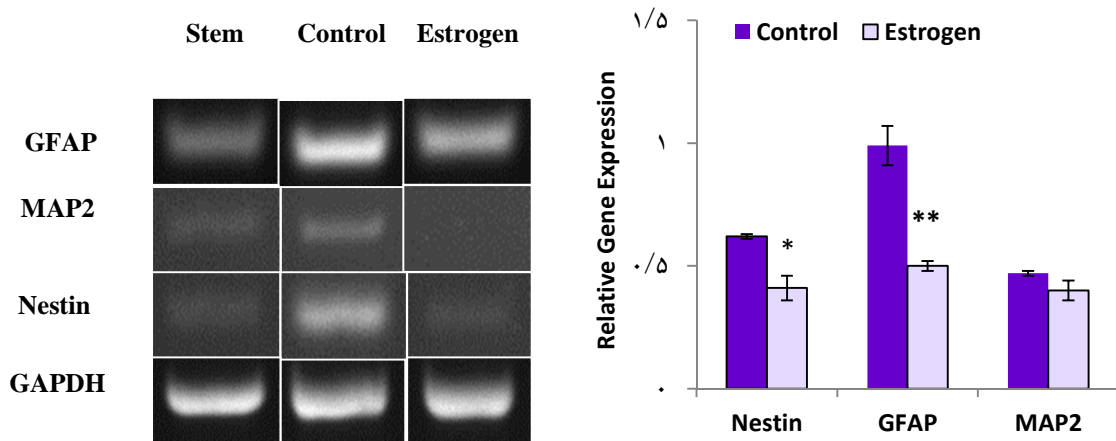
جدول ۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی پرایمرها	اندازه‌ی محصول
GFAP	۳'-CCTCTCCCTGGCTCGAATG-۵F- ۳'-GGAAGCGAACCTTCTCGATGTA-۵R-	۱۶۱ bp
Nestin	۳'-AACAGCGACGGAGGTCTCTA-۵F- ۳'-TTCTCTTGTCCCGCAGACTT-۵R-	۲۲۰ bp
MAP۲	۳'-TCAGAGGCAATGACCTTACC-۵F- ۳'-GTGGTAGGCTCTTGGTCTTT-۵R-	۳۲۱ bp
GAPDH	۳'-GGGCTGCTTTTAACTCTGGT-۵F- ۳'-GCAGGTTTTTCTAGACG-۵R-	۶۸۰ bp

GFAP: Glial fibrillary acidic protein; MAP2: Microtubule-associated protein2; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ مرحله‌ی کنتراست از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (A)، تشکیل توده‌های کروی نروسفر (B)، تمایز نهایی سلول‌های شبه عصبی (C)



شکل ۲. مقایسه‌ی باندهای حاصل از تکنیک RT-PCR و مقایسه‌ی نیمه‌ی کمی باندهای نشانگرهای GFAP، MAP2، Nestin و Nestin در سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز یافته در گروه شاهد و مورد. میزان بیان نشانگرهای GFAP و Nestin به طور معنی‌دار در گروه مورد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ).

RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; MAP2: Microtubule-associated protein2; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

میزان بقای سلولی در گروه شاهد  $0.46 \pm 0.05$  و در گروه مورد  $0.56 \pm 0.09$  بود که این اختلاف میانگین، از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. بنابراین، استروژن باعث افزایش تکثیر سلولی می‌شود؛ اگر چه از لحاظ آماری این افزایش معنی‌دار نبود.

#### تکنیک RT-PCR

همان‌طور که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود، میانگین بیان نشانگر Nestin در گروه شاهد نسبت به گروه

سپس سلول‌های منفرد حاصل از نروسفرها در محیط القای تمایز نهایی به صورت سلول‌های کشیده و دارای زواید متعدد شبیه سلول‌های عصبی در کف فلاسک مشاهده شد. این سلول‌ها، از طریق زوایدشان با یکدیگر ارتباط داشتند (تصویر C ۱).

#### MTT assay

پس از جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز با استفاده از آزمون ANOVA (Analysis of variance) انجام گرفت. یافته‌های حاصل از ارزیابی MTT نشان داد که میانگین

نیز از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد؛ اما کاهش که در بیان نشانگر MAP2 در گروه مورد مشاهده می‌شود، چشمگیر نیست و از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

در مطالعه‌ای که Brannvall و همکاران انجام دادند، اثر 17-بتا استرادیول را در میزان پروليفراسیون سلول‌های بنیادی عصبی جنینی و بالغین بررسی و مشاهده نمودند که در گروه مورد، میزان تولید سلول‌های بنیادی عصبی کاهش یافت که این کاهش در سلول‌های بنیادی عصبی که از مغز فرد بالغ استخراج شده بود، بیشتر بود. در این مطالعه، علاوه بر عامل رشد EGF در گروه مورد، میزان 10 نانومول 17-بتا استرادیول هم اضافه شده بود. همچنین، این مطالعه نشان داد که 17-بتا استرادیول می‌تواند میزان تکثیر سلول‌های نوروں بالغ را نسبت به سلول‌های گلیال حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی عصبی جنینی افزایش دهد. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که استروژن از طریق گیرنده‌های خود می‌تواند بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی تأثیر گذارد (34).

در مطالعه‌ی Wang و همکاران، مشخص گردید ماده‌ی Allopregnanolone که یک نورواستروئید می‌باشد، تولید سلول عصبی را در نوروں‌های هیپوکامپ جنینی در محیط آزمایشگاهی افزایش می‌دهد و این اثر وابسته به دوز است. همچنین نشان داده شد که دوز 500-1000 نانومول Allopregnanolone به صورت قابل توجهی تعداد سلول‌های تکثیر یافته (BrdU مثبت) را افزایش می‌دهد؛ در حالی که دوزهای بیشتر از 1000 نانومول باعث کاهش می‌شوند (42).

در مطالعه‌ی Kai و Okada، اثر 17-بتا استرادیول بر میزان پروليفراسیون و تمایز سلول‌های بنیادی

مورد بیشتر بود و این اختلاف میانگین، معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). به علاوه، میانگین بیان نشانگر GFAP در گروه مورد نسبت به گروه شاهد کمتر بود و این اختلاف میانگین نیز از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/01$ )؛ در حالی که بیان نشانگر MAP2 در گروه مورد با این که نسبت به گروه شاهد کاهش داشته است؛ اما این اختلاف، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ( $P = 0/16$ ).

### بحث

استروژن یکی از مهم‌ترین هورمون‌هایی است که اثرات مختلفی بر بافت‌های بدن به ویژه بافت‌های عصبی دارد. استروژن، همچنین در روند تمایز جنینی نقش مهمی دارد و می‌تواند بر تکامل ساختار مغز و همچنین حالات، ادراک و احساسات تأثیر مختلفی داشته باشد.

با توجه به سهولت دستیابی به سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی نسبت به سایر منابع سلول‌های بنیادی مانند مغز استخوان، در صورتی که از این سلول‌ها در حضور استروژن تمایز بیشتر نرونی به دست آید، می‌توان از نروں‌های تمایز یافته، در پیوند اتولوگ بیماری‌های عصبی دژنراتیو خاص مانند بیماری پارکینسون و ضایعات نخاعی استفاده نمود. در این مطالعه، تأثیر استروژن بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که تحت شرایط خاص به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابد، بررسی شد و میزان تمایز عصبی از طریق بیان نشانگرهای مختلف عصبی از طریق تکنیک RT-PCR ارزیابی گردید. در این مطالعه، مشخص شد اگر چه استروژن می‌تواند سبب کاهش بیان نشانگرهای Nestin و GFAP شود و این کاهش

موش ارزیابی شد. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی از ناحیه‌ی تالانسفال موش‌ها در روز ۱۵ جنینی به دست آمده بود و از FGF-۲ نیز به عنوان یک عامل میتوژن در تحریک تکثیر سلول‌های بنیادی استفاده شد. آن‌ها دریافتند که استروژن در غیاب FGF-۲ می‌تواند منجر به تحریک نوروزن در سلول‌های بنیادی شود. همچنین، در این مطالعه نشان داده شد که استروژن نسبت سلول‌های گلیال را به کل سلول‌ها افزایش می‌دهد؛ هر چند این نسبت هنگام استفاده از عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF یا Platelet-derived growth factor) و یا نوروتروپین ۳ تغییر نکرد (۴۳).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Sekiguchi و همکاران انجام شد، تأثیر استروژن بر سلول‌های بنیادی عصبی بررسی شد. سلول‌های بنیادی عصبی از مغز استخراج و به عصب سیاتیک آسیب دیده منتقل شد. به علاوه، به یک گروه استروژن داده شد و گروه دیگر بدون استروژن بودند. در گروهی که به آن‌ها

استروژن داده شده بود، به طور معنی‌داری عصب بهبود یافت. آنان گزارش نمودند که استروژن باعث تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی می‌شود (۴۴). با توجه به مطالعات انجام گرفته در این زمینه، می‌توان دریافت که اختلاف در نتایج ناشی از نوع سلول، دوز مصرفی و مدت زمان مورد مطالعه می‌باشد. در مجموع، می‌توان دریافت اگر چه در این مطالعه استروژن موجب کاهش بیان نشانگر سلول‌های عصبی بالغ گردید، اما این تغییرات چندان واضح و مشخص نبود. از این رو، پیشنهاد می‌شود اثرات استروژن با استفاده از تکنیک‌های دیگر و به طور گسترده‌تر بررسی گردد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در زمینه‌ی انجام طرح پژوهشی حاضر (به شماره‌ی ۱۸۷۱۲۸) مساعدت نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

### References

1. Barami K, Hao HN, Lotoczky GA, Diaz FG, Lyman WD. Transplantation of human fetal brain cells into ischemic lesions of adult gerbil hippocampus. *J Neurosurg* 2001; 95(2): 308-15.
2. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17(4): 331-40.
3. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002; 20(5): 1060-9.
4. da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 11): 2204-13.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
6. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164(2): 247-56.
7. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22(4): 487-500.
8. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417): 1168-70.
9. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells

- derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893): 41-9.
10. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61(4): 364-70.
  11. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
  12. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-28.
  13. Halvorsen YD, Bond A, Sen A, Franklin DM, Lea-Currie YR, Sujkowski D, et al. Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism* 2001; 50(4): 407-13.
  14. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(2): 763-9.
  15. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002; 69(6): 908-17.
  16. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 2004; 77(2): 174-91.
  17. Croft AP, Przyborski SA. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells* 2006; 24(8): 1841-51.
  18. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1701-10.
  19. Egusa H, Schweizer FE, Wang CC, Matsuka Y, Nishimura I. Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. *J Biol Chem* 2005; 280(25): 23691-7.
  20. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(Suppl 1): 11854-60.
  21. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 2001; 63(1): 29-60.
  22. Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 2003; 71(1): 31-41.
  23. Saravia FE, Beauquis J, Revsin Y, Homo-Delarche F, de Kloet ER, de Nicola AF. Hippocampal neuropathology of diabetes mellitus is relieved by estrogen treatment. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26(4-6): 943-57.
  24. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 2007; 72(5): 381-405.
  25. Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 2006; 29(2): 209-15.
  26. Toran-Allerand CD. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* 2004; 145(3): 1069-74.
  27. Lephart ED. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev* 1996; 22(1): 1-26.
  28. Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. *Eur J Neurosci* 2006; 24(12): 3475-88.
  29. Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(35): 13198-202.
  30. Yague JG, Munoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 2006; 138(2): 389-401.
  31. Wiltout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int* 2007; 50(7-8): 1028-41.
  32. Leker RR, Soldner F, Velasco I, Gavin DK, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke* 2007; 38(1): 153-61.
  33. Suzuki S, Gerhold LM, Bottner M, Rau SW, Dela CC, Yang E, et al. Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol* 2007; 500(6): 1064-75.
  34. Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21(3): 512-20.
  35. Ivanova T, Karolczak M, Beyer C. Estradiol stimulates GDNF expression in developing



- hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2002; 143(8): 3175-8.
36. Bimonte-Nelson HA, Nelson ME, Granholm AC. Progesterone counteracts estrogen-induced increases in neurotrophins in the aged female rat brain. *Neuroreport* 2004; 15(17): 2659-63.
37. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* 1994; 140(3): 256-61.
38. Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(4): 631-52.
39. Lafferty FW, Fiske ME. Postmenopausal estrogen replacement: a long-term cohort study. *Am J Med* 1994; 97(1): 66-77.
40. Kang JH, Lee CK, Kim JR, Yu SJ, Jo JH, Do BR, et al. Estrogen stimulates the neuronal differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (CD34-). *Neuroreport* 2007; 18(1): 35-8.
41. Razavi S, Mardani M, Kazemi M, Esfandiari E, Narimani M, Esmaeili A, et al. Effect of leukemia inhibitory factor on the myelinogenic ability of Schwann-like cells induced from human adipose-derived stem cells. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33(2): 283-9.
42. Wang JM, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J Neurosci* 2005; 25(19): 4706-18.
43. Okada A, Kai O. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J Androl* 2008; 10(2): 271-6.
44. Sekiguchi H, Ii M, Jujo K, Thorne T, Ito A, Klyachko E, et al. Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve. *Angiogenesis* 2013; 16(1): 45-58.

## Effects of Estrogen on the Expression of Neural Markers in Differentiated Adipose-Derived Stem Cells

Shahnaz Razavi PhD<sup>1</sup>, Nafiseh Ahmadi MSc<sup>2</sup>, Mohammad Kazemi MSc<sup>3</sup>,  
Hamid Reza Sadeghian<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Over the past decade, researchers have used the existing knowledge about pathways messaging protocols to successfully stimulate stem cells to generate neurons. Due to the ease of access to adipose tissue-obtained stem cells rather than other sources, whereas estrogen factor could be used to improve neural differentiation, antilogous transplantation of differentiated neurons would be widely used for certain degenerative neurological diseases such as Parkinson's disease and spinal cord injuries. The purpose of this study was to evaluate the effect of estrogen on expression of microtubule-associated protein-2 (MAP2), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Nestin markers.

**Methods:** After the isolation of stem cells from adipose tissue, the neural induction was carried out through neurosphere construction; then, final differentiation of the cells was performed. Neurosphere-sing cell were transferred to neural induction medium (control group). In the estrogen-treated group, estrogen was added to the culture medium until the end of the day of distinction. Then, evaluation of the expression of neural markers, was performed using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. In addition, MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was performed to assess cell viability.

**Findings:** The mean expression of GFAP and Nestin markers were down regulated in treated group compared to controls ( $P < 0.05$ ). The difference between the mean of MAP2 expression was not significant between the two groups. In addition, the difference between the mean of cell viability was not significant between two groups, too.

**Conclusion:** In this study, we found that estrogen can decrease the expression of neuronal markers. However, to determine the effect of estrogen on neurogenic differentiation of stem cells, next studies should be done broader using other precise techniques.

**Keywords:** Estrogen, Neurogenesis, Adipose-derived stem cell, Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

**Citation:** Razavi Sh, Ahmadi N, Kazemi M, Sadeghian HR. **Effects of Estrogen on the Expression of Neural Markers in Differentiated Adipose-Derived Stem Cells.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(345): 1239-49

1- Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- PhD Student, Department of Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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

**Corresponding Author:** Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir

## بررسی اثرات گیرنده‌ی ۳-T-Cell Immunoglobulin Mucin (TIM-۳) در مهار تکثیر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)

نرگس زرگر بالاجمع<sup>۱</sup>، دکتر مهدی شعبانی<sup>۲</sup>، منصوره حقیقی<sup>۳</sup>، احمد علی بیات<sup>۴</sup>، دکتر محمود آقائی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** TIM-3 (T-cell immunoglobulin-mucin) به گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی و Transmembrane اطلاق می‌شود. TIM-3 دسته‌ای از TIMها می‌باشد که نقش مهمی در تکثیر، تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری دارا است. تحقیق حاضر جهت بررسی میزان بیان ژن TIM-3 و نقش گالکتین-۹ به عنوان لیگاند گیرنده‌ی TIM-3 در مهار تکثیر دو رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) یا Acute lymphoblastic leukemia) مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** جهت بررسی میزان بیان ژن TIM-3 در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ از روش Real-time polymerase chain reaction استفاده شد. سپس، میزان مهار رشد سلولی در سلول‌های حاصل از کشت رده‌های سلولی پیش‌گفته، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ (۱۰۰-۰/۰۱ نانومولار) با استفاده از روش MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** ژن TIM-3 در هر دو نوع رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ در سطح mRNA بیان شد. میزان بیان TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat نسبت به KE-37، افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/001$ ); به طوری که، در رده‌ی سلولی Jurkat میزان بیان ژن TIM-3 حدود ۳/۹ برابر در مقایسه با رده‌ی سلولی KE-۳۷ بود. همچنین، در هر دو رده‌ی سلولی، گالکتین-۹ در غلظت‌های بالاتر از ۱ نانومولار به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد اثر مهار تکثیر داشت ( $P < 0/050$ ).

**نتیجه‌گیری:** مطالعه‌ی حاضر یک مکانیسم احتمالی را در کنترل رشد سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد توسط گیرنده‌ی TIM-3 معرفی می‌کند. بر اساس این مطالعه، گیرنده‌ی TIM-3 در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ بیان می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه تأیید نمود که گالکتین-۹ دارای اثرات مهاری در تکثیر هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** T-cell immunoglobulin-mucin، گالکتین-۹، لوسمی لنفوبلاستیک حاد

**ارجاع:** زرگر بالاجمع نرگس، شعبانی مهدی، حقیقی منصوره، بیات احمد علی، آقائی محمود. بررسی اثرات گیرنده‌ی ۳-T-Cell Immunoglobulin Mucin (TIM-۳) در مهار تکثیر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL). مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۵): ۱۲۶۰-۱۲۵۰

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

۲- استادیار، پژوهشکده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی ابن سینا، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس ارشد، پژوهشکده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی ابن سینا، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۵- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: maghaei@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمود آقائی

## مقدمه

لوسمی حاد شایع‌ترین بدخیمی کودکان است. ۷۷ درصد لوسمی‌های کودکان از نوع لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia یا ALL) و ۱۱ درصد از نوع میلو بلاستیک می‌باشد (۱-۲). در لوسمی لنفوبلاستیک حاد، پیش‌سازهای لنفوسیت T و B درگیر می‌شوند (۳). در سال‌های اخیر کشف روند مولکولی ایجاد و پیشرفت لوسمی لنفوبلاستیک حاد، منجر به شناسایی اهداف مولکولی سلول‌های سرطانی شده است؛ به طوری که با هدف قرار دادن مسیرهای انتقال پیام درون سلولی، می‌توان سلول‌های سرطانی را از بین برد (۴). انتقال پیام‌های مولکولی از سطح خارج سلول به داخل سلول از طریق اتصال لیگاند خارج سلولی به گیرنده‌ی خود صورت می‌گیرد که باعث فعال شدن آبشار داخل سلولی گیرنده می‌شود. به دنبال فعال شدن آبشار داخل سلولی، مسیرهای انتقال پیام درون سلولی در سلول فعال می‌گردد که در فرایندهای اساسی سلول از جمله تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش دارند (۴).

جستجو برای یافتن لیگاندها و گیرنده‌های جدید سطح سلولی جهت مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، منجر به شناسایی یک فامیل ژنی جدید شد که پروتئین‌های T-cell immunoglobulin-mucin (TIM) نام گرفتند (۵-۶). TIMها گلیکوپروتئین سطح سلولی و عبور کننده از غشا (Transmembrane) می‌باشند که یک دومین ایمونوگلوبولینی در ناحیه‌ی N-terminal، یک دومین شبه موسینی در ناحیه‌ی خارج سلولی و یک دم سیتوپلاسمی دارند و حاوی یک موتیف فسفریلاسیون تیروزین کینازی می‌باشند. TIMها بر اساس اندازه‌ی

دومین موسینی به سه انواع ۱-۸ تقسیم می‌گردند که فقط انواع ۱، ۳ و ۴ در انسان بیان می‌شود (۷-۸). TIM-۳ دارای کوچک‌ترین دومین موسینی در بین انواع TIMها است، اما دومین سیتوپلاسمی آن بزرگ‌تر از سایر TIMها می‌باشد؛ یعنی به جای یک تیروزین، ۵ تیروزین جهت فسفریلاسیون دارد. TIM-۳ باعث فسفریلاسیون STAT۳ (Signal transducer and activator of transcription۳) و IL۶ (Interleukin-۶) می‌گردد و با توجه به این‌که مسیر IL۶-STAT۳ نقش مهمی در متاستاز تومور ایفا می‌نماید، TIM-۳ از طریق این مسیر نقش مهمی را در تکثیر، تهاجم و متاستاز سلول‌های تومور دارد (۸-۱۰).

مطالعات اخیر حاکی از نقش TIM-۳ در سرکوب سیستم ایمنی وابسته به تومور می‌باشد. محققان نشان داده‌اند که بیان mRNA و پروتئین TIM-۳ در سرطان سرویکس در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشته است. همچنین، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که افزایش بیان TIM-۳، باعث متاستاز تومور به سایر ارگان‌ها می‌گردد. در مطالعه‌ی دیگری نقش TIM-۳ در سلول‌های HeLa بررسی گردید و نشان داده شد که با استفاده از خاموش سازی ژن TIM-۳، مهاجرت، تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری HeLa کاهش می‌یابد (۱۱).

گالکتین-۹ یکی از اعضای خانواده‌ی لکتین و متصل شونده به  $\beta$ -گالاکتوزید و دارای دو دومین N و C ترمینال می‌باشد که با یک واسطه کربوهیدراتی به هم متصل شده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از عملکردهای گالکتین-۹ با واسطه‌ی گیرنده‌ی TIM-۳ صورت می‌گیرد و از گالکتین-۹ به عنوان

در دو رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پرداخت. در مرحله‌ی دوم، نقش گالکتین-۹ به عنوان لیگاند گیرنده‌ی TIM-۳ در مهار تکثیر دو رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد بررسی گردید.

### روش‌ها

کشت سلولی: رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ مربوط به لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی به صورت رشد داده شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از ضد عفونی کردن اطراف فلاسک‌ها با الکل ۷۰ درصد و مشاهده‌ی تراکم سلول‌ها زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۹۵ درصد هوای مرطوب و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شد. فلاسک‌ها روزانه به وسیله‌ی میکروسکوپ از نظر رشد و تراکم سلولی، مورفولوژی سلولی و همچنین، کنترل عدم آلودگی باکتریایی و قارچی مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت فلاسک‌ها هر ۲-۱ روز یکبار تعویض شد. برای تعویض محیط کشت فلاسک‌ها زیر هود لامینار، محیط کشت کهنه به همراه سلول‌ها به لوله‌های استریل منتقل و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده، محیط رویی خالی و رسوب حاصل به فلاسک‌ها که حاوی RPMI-۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute)، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر استرپتومایسین می‌باشد، اضافه شد. بررسی بیان گیرنده‌ی TIM-۳ در رده‌های سلولی

لیگاند گیرنده‌ی TIM-۳ استفاده شده است (۱۲-۱۳). در حال حاضر، مشخص شده است که گالکتین-۹ در فرایندهای سیکل سلولی، آپوپتوز، متاستاز و آنژیوژنز دخالت دارد (۱۴-۱۵). در چندین مطالعه گزارش گردید که گالکتین-۹ باعث مهار تکثیر انواع مختلف سلول‌های سرطانی مانند لوسمی، Burkitt's lymphoma, Multiple myeloma و Hodgkin می‌شود و این اثرات از طریق اتصال به گیرنده‌ی TIM-۳ صورت می‌گیرد (۱۶).

مطالعه‌ی Kobayashi و همکاران نشان داد که گالکتین-۹ باعث مهار تکثیر سلول‌های میلوما می‌شود (۱۷). در مطالعه‌ی دیگری گزارش گردید که گالکتین-۹ منجر به مهار رشد سلول‌های ملانوما می‌گردد (۱۸). همچنین، گالکتین-۹ با اتصال به TIM-۳ باعث القای آپوپتوز در سلول‌های T تمایز یافته‌ی بالغ و به میزان کمتر در سلول‌های CD8<sup>+</sup> T و علاوه بر این، باعث مهار پاسخ‌های سلول Th۱ و کاهش INF (Interferon) می‌گردد (۱۹). با توجه به نقش مهمی که گیرنده‌ی TIM-۳ در توسعه، گسترش و عملکرد تومور دارد، تعیین الگوی بیان و ترسیم نحوه‌ی عملکرد آن‌ها برای انتخاب شیوه‌ی درمانی، می‌تواند از اهمیت فراوانی برخوردار باشد. همچنین، تعیین مقادیر کمی بیان ژن TIM-۳ در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد، از جمله اولین اقدامات برای فرایندهای درمانی در سرطان به شمار می‌رود.

از آن‌جایی که مرحله‌ی اول در مورد اثرات TIM-۳، بررسی میزان بیان ژنی آن از طریق بررسی mRNA می‌باشد، تحقیق حاضر با استفاده از روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)، به بررسی میزان بیان ژن TIM-۳

KE-7 و Jurkat لوسمی لنفوبلاستیک حاد با استفاده از روش Real-Time PCR: استخراج RNA سلولی: استخراج RNA تمام سلولی با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت سینا کلون) و بر اساس دستورالعمل کیت به شرح زیر انجام شد. حدود یک میلیون سلول از هر رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 برداشته شد و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه (در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) سانتریفوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب باقی‌مانده ورتکس گردید. سپس، ۱ میلی‌لیتر محلول سرد RNX-Plus به نمونه‌ها اضافه و ۳۰ ثانیه ورتکس و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به هر یک از نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی با Shake کردن مخلوط شد. نمونه‌ها روی یخ به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز مایع هر یک از نمونه‌ها به یک میکروتیوب فاقد RNase انتقال داده شد و به حجم برابر این فاز مایع، ایزوپروپانول اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه و دوباره با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به هر یک از نمونه‌ها اضافه گردید و کمی ورتکس و مجدد به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه (در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) سانتریفوژ انجام گرفت. محلول رویی به طور کامل برداشته شد و رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب فاقد RNase و DNase حل گردید. پس از استخراج RNA، برای بررسی

کمی از دستگاه NanoDrop استفاده شد. سنتز cDNA (واکنش نسخه‌برداری معکوس RT): برای دستیابی به cDNA با کیفیت بالا، RNA استخراج شده از مرحله‌ی قبل برای هر یک از رده‌های سلولی Jurkat و KE-37، بلافاصله به منظور ساخت cDNA توسط کیت M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H Vivantis مورد استفاده قرار گرفت. مراحل واکنش بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر به انجام رسید. به ۵ میکرولیتر RNA استخراج شده در مرحله‌ی قبل، ۱ میکرولیتر Oligo dT، ۱ میکرولیتر dNTP (Deoxynucleotide) و ۳ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز اضافه گردید و در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۲ میکرولیتر بـا فـا ر آنـزیم M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) و ۱ میکرولیتر آنزیم RT M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse transcriptase) اضافه و در نهایت با ۷ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز، حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. محصول نهایی تا زمان انجام واکنش Real-time PCR در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش Real-time PCR با استفاده از SYBER Green: واکنش Real-time RT PCR توسط دستگاه (Corbett) Rotor-Gene 6000 و با استفاده از کیت AMPLIQON انجام گرفت. بدین ترتیب که به ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس

روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-] MTS carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]: برای ارزیابی سیتوتوکسیسیته، در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ تایی،  $10^3 \times 5$  از هر کدام رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها وارد فاز رشد شدند، تیمار گردیدند. بدین ترتیب، غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ (۱۰۰-۰/۰۱ نانومولار) که در محیط RPMI تهیه شده بود، به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد و به چاهک‌های شاهد، محیط کشت کامل اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTS به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، جذب محلول هر چاهک در مقابل شاهد، در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه مولتی پلیت ریدر (Biotech, Synergy) ساخت کشور آمریکا خوانده شد. نتایج بر حسب درصد سلول‌های زنده‌ی تیمار شده نسبت به شاهد، از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

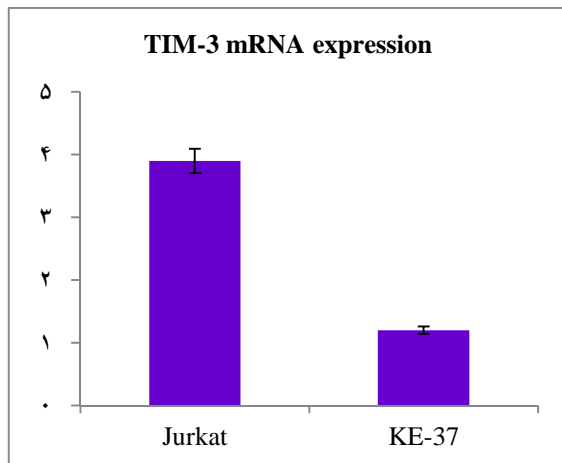
درصد سلول‌های زنده (Viability) = (میانگین جذب سلول‌های شاهد / میانگین جذب سلول‌های بیمار)  $\times 100$

AMPLIQON، ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های TIM-۳ و Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (جدول ۱) و ۷/۵ میکرولیتر آب فاقد RNase و DNase اضافه گردید و حجم نهایی هر واکنش، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. سپس، برنامه‌ی حرارتی Real-time PCR در دو مرحله که مرحله‌ی اول (Denaturation) به مدت ۱۵ دقیقه برای یک سیکل و مرحله‌ی دوم (Annealing و Polymerization) برای ۴۰ سیکل به ترتیب در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه به دستگاه داده شد. پس از این که واکنش به اتمام رسید، دستگاه اطلاعاتی را نمایش داد که از جمله مهم‌ترین آن، منحنی پیش‌سرفت واکنش و Ct (Crossing of threshold) می‌باشد. بعد از به دست آمدن تمام Ct‌ها (ژن کنترل و ژن اصلی)، از روش محاسباتی دلتا دلتا Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) برای به دست آوردن نسبت بیان ژن در دو سلول استفاده گردید. سپس با استفاده از معادله  $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، میزان نسبی افزایش بیان ژن مورد نظر در دو رده‌ی سلولی محاسبه می‌شود. بررسی سیتوتوکسیسیته با استفاده از

جدول ۱. توالی پرایمر ژن‌های GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) و TIM-۳ (T-Cell Immunoglobulin Mucin-۳)

ژن	توالی پرایمرها	کد ژن
GAPDH	Forward 5'-CTCCCCTTCGCTCTCTG-3' Revers 5'-TCCGTTGACTCCGACCTTC-3'	NM-001289745.1
TIM-۳	Forward 5'-TCCAAGGATGCTTACCACCAG-3' Revers 5'-GCCAATGTGGATATTTGTGTTAGATT-3'	AB924452.1

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TIM-۳: T-Cell immunoglobulin mucin



شکل ۱. میزان بیان ژن TIM-3 در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37

تمام تست‌ها به صورت تکرار سه‌تایی انجام شد و نتایج بر اساس درصد بقای سلول‌ها نسبت به گروه شاهد (میزان بقا در گروه شاهد ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد) و به صورت میانگین و انحراف معیار در مقایسه با شاهد ارایه گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA (Dunnett's test) در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

#### مقایسه‌ی الگوی بیان گیرنده‌ی TIM-3 در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37

واکنش Real-time PCR برای هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37، با استفاده از رنگ SYBER Green برای دو ژن TIM-3 و GAPDH (به عنوان شاهد داخلی) صورت گرفت. بعد از به دست آمدن اطلاعات مربوط به Ct واکنش‌ها و انجام محاسبات بر روی داده‌ها، میانگین نسبی بیان ژن TIM-3 در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 محاسبه گردید. همچنین، با انجام تجزیه و تحلیل آماری بر روی داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA، معنی‌دار بودن تفاوت‌ها بررسی شد. نسبت میانگین بیان TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat در مقایسه با رده‌ی سلولی KE-37، حدود ۳/۹ برابر بود ( $P > 0/001$ ) که نشان می‌دهد بیان نسبی TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat حدود چهار برابر بیشتر از بیان این ژن در رده‌ی سلولی KE-37 می‌باشد (شکل ۱).

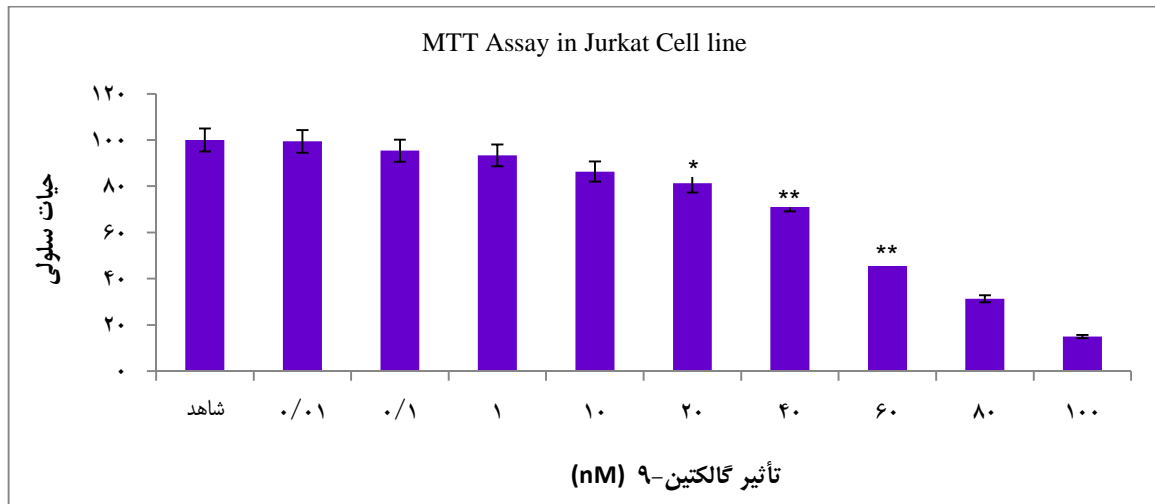
#### تأثیر لیگاند گیرنده‌ی TIM-3 بر روی تکثیر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد با استفاده از تست MTS

اثر لیگاند گیرنده‌ی TIM-3 (گالکتین-۹) در مهار تکثیر رده‌های سلولی (Jurkat و KE-37) لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسان با استفاده از تست MTS بررسی شد. در نهایت درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 در غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ به دست آمد. به این ترتیب که سلول‌های مورد نظر تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت گالکتین-۹ (۱۰۰-۰/۰۱ نانومولار) قرار گرفت و ۴۸ ساعت انکوبه شد. نتایج پس از پایان زمان انکوباسیون نشان داد که گالکتین-۹ در غلظت‌های پایین (۱-۰/۰۱ نانومولار) در مقایسه با شاهد اثر قابل ملاحظه‌ای نداشت و کاهش معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده مشاهده نشد ( $P > 0/050$ )؛ در حالی که تیمار سلول‌ها با غلظت‌های بالاتر گالکتین-۹ (۱۰۰-۱ نانومولار) در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد و این تأثیر گالکتین-۹ وابسته



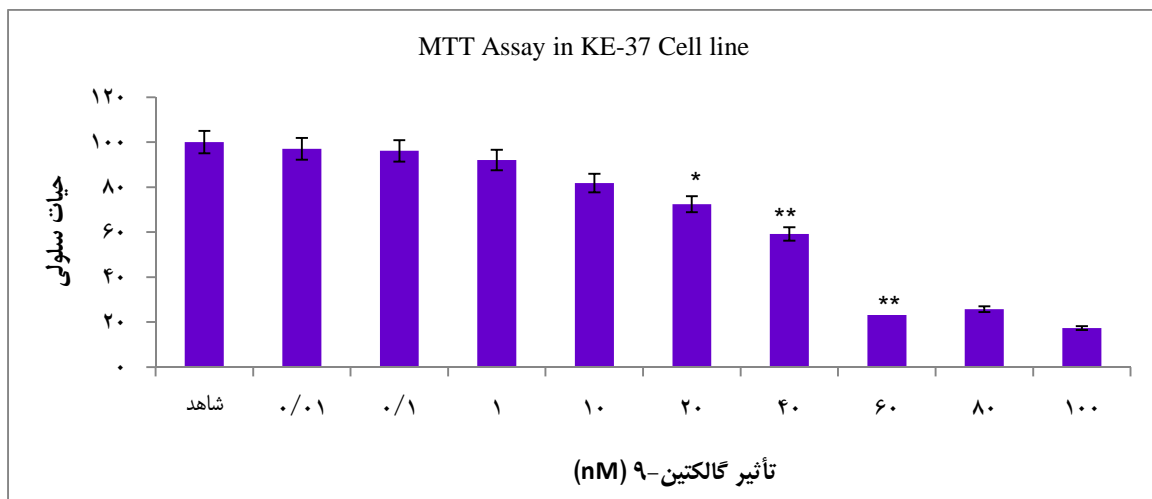
به غلظت بود ( $P < 0/050$ ). همچنین، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیشترین میزان مهار تکثیر سلولی، در غلظت ۱۰۰ نانومولار گالکتین-۹ می‌باشد؛ به طوری که درصد سلول‌های زنده در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ به ترتیب به ۱۵ و ۱۷/۳۹ درصد رسید.

همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت گالکتین-۹ در هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷، درصد سلول‌های زنده در غلظت ۱ نانومولار به صورت معنی‌داری کاهش یافت



شکل ۲. تأثیر گالکتین-۹ در مهار رشد سلول لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی Jurkat

سلول‌ها با غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ تیمار شدند و درصد زنده ماندن آن‌ها پس از ۴۸ ساعت به وسیله‌ی تست MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] اندازه‌گیری گردید. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد.  $P < 0/050^*$  و  $P < 0/010^{**}$  معنی‌دار است.



شکل ۳. تأثیر گالکتین-۹ در مهار رشد سلول لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی KE-۳۷

سلول‌ها با غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ تیمار شدند و درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت به وسیله‌ی تست MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] اندازه‌گیری گردید. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد.  $P < 0/050^*$  و  $P < 0/010^{**}$  معنی‌دار است.

## بحث

مطالعات اخیر حاکی از نقش TIM-3 در سرکوب سیستم ایمنی وابسته به تومور می‌باشد. محققان نشان داده‌اند که بیان mRNA و پروتئین TIM-3 در سلول‌های بافت سرطان سرویکس افزایش می‌یابد. همچنین، نتایج تحقیقات گزارش کرده‌اند که افزایش بیان TIM-3 باعث متاستاز تومور به سایر ارگان‌ها می‌گردد. در مطالعه‌ی دیگری نقش TIM-3 در سلول‌های HeLa بررسی گردید و نشان داده شد که با استفاده از خاموش سازی ژن TIM-3، مهاجرت، تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری HeLa کاهش می‌یابد (۱۱). مطالعات به این نتیجه رسیده‌اند که TIM-3 در بافت‌های بدخیم سرطان پروستات نسبت به بافت‌های خوش خیم و بافت‌های طبیعی، میزان بیان بیشتری دارد. همچنین، نشان داده شد که بیان TIM-3 پیش آگهی ضعیفی در سرطان پروستات دارد (۲۰). افزایش بیان TIM-3 در سرطان ریه نیز مشاهده شده است (۲۱). مطالعات جدید حاکی از آن است که TIM-3 در سلول‌های بنیادی لوکمیک بیان می‌گردد. سلول‌های بنیادی لوکمیک به علت سطح بالای بیان CD<sub>۱۳۳</sub> و پروتئین‌های دیگری مانند TIM-3 و CD<sub>۳۴</sub> روی سطح سلولی‌شان، با انواع طبیعی سلول‌های بنیادی متفاوت هستند (۲۲-۲۳).

تحقیقی در مورد بیان TIM-3 در سطح ژن در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسان انجام نگرفته است. از این رو، تحقیق حاضر بر مبنای تحلیل و بررسی گیرنده‌ی TIM-3 بر روی سطوح بیان ژن و بررسی اثرات لیگاند TIM-3 (گالکتین-۹) در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ هدف‌گذاری گردید. از آن‌جا که

اولین قدم در مورد تعیین گیرنده‌ی TIM-3، بررسی میزان بیان ژن آن‌ها از طریق بررسی mRNA مربوط به آن‌ها می‌باشد، تحقیق حاضر با استفاده از روش Real-time PCR به منظور بررسی میزان بیان (تفاوت کمی) در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ انجام گرفت. بهترین روش برای تعیین کمی مقادیر بیان ژن، روش Real-time PCR است. این روش قادر به تحلیل مقادیر کمی بیان یک ژن با دقت و صحت بالا می‌باشد و می‌تواند نتایج مفیدی را برای مقاصد تحقیقاتی و در نهایت مقاصد درمانی ارائه دهد. نتایج به دست آمده بدین صورت بود که ژن TIM-3 در هر دو نوع رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ در سطح mRNA بیان می‌گردد. از آن‌جا که روش استفاده شده در این مرحله به صورت کمی بود، امکان مقایسه‌ی میزان بیان ژن TIM-3 در سطح mRNA را بین رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ فراهم می‌کرد.

بر اساس نتایج بررسی حاضر، میزان بیان TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat نسبت به KE-۳۷، افزایش معنی‌داری ( $P < ۰/۰۰۱$ ) داشت؛ به طوری که میزان بیان ژن TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat، حدود ۳/۹ برابر در مقایسه با رده‌ی سلولی KE-۳۷ بود.

گالکتین-۹ باعث مهار تکثیر سلول‌های میلوما با مهار مسیر سیگنالینگ Jun N-terminal kinase (JNK) و P۳۸ می‌شود (۱۷). همچنین، باعث مهار رشد سلول‌های ملانوما می‌گردد. مسیرهای درگیر در مرگ سلولی که توسط گالکتین-۹ القا می‌شود، شامل آپوپتوز وابسته به کاسپاز (۲۴، ۱۹، ۱۳)، فعال‌سازی Ca<sup>۲+</sup>/Calpain، آزادسازی فاکتورهای پیش‌میتوکندریایی یا مهار پیشرفت چرخه‌ی سلولی می‌باشد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز پس از اثبات

گیرنده‌ی TIM-3 معرفی می‌کند و بر این اساس، گیرنده‌ی TIM-3 در رده‌های سلول‌های Jurkat و KE-37 بیان می‌گردد. همچنین، نتایج تأیید نمود که گالکتین-9 اثرات مهاری در تکثیر هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 دارد. بدین جهت، انجام مطالعات آزمایشگاهی بیشتر جهت مشخص نمودن مکانسیم‌های آپوپتوز دخیل در مرگ سلولی پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوشیمی بالینی به شماره‌ی طرح ۳۹۳۴۸۴ دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

بیان TIM-3 در سطح mRNA، اثر گالکتین-9 در مهار تکثیر سلولی بر روی رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 بررسی گردید. همچنین، نتایج نشان داد که گالکتین-9 در غلظت‌های بالاتر از ۱ نانومولار، باعث مهار رشد سلول‌های Jurkat و KE-37 می‌شود؛ در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر (۰/۰۱-۱ نانومولار) این اثر مشاهده نشد. بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، گالکتین-9 در بیشترین غلظت مورد بررسی در رده‌ی Jurkat، درصد سلول‌های زنده را تا ۱۵ درصد و در KE-37 تا ۱۷/۳۹ درصد کاهش می‌دهد.

### نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر یک مکانسیم احتمالی را در کنترل رشد سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد توسط

### References

- Bomken SN, Vormoor JH. Childhood leukaemia. *Paediatr Child Health* 2009; 19(8): 345-50.
- Tubergen DG, Bleyer A. Leukemia. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. *Nelson textbook of pediatrics*. 17<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2004. p. 1694-7.
- Parikh C, Ren R. Mouse model for NRAS-induced leukemogenesis. *Methods Enzymol* 2008; 439: 15-24.
- Rowinsky EK. Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer. *Oncologist* 2003; 8(Suppl 3): 5-17.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7): 2348-57.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002; 415(6871): 536-41.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272(5258): 60-6.
- Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 2007; 318(5853): 1141-3.
- van de Weyer PS, Muehlefeit M, Klose C, Bonventre JV, Walz G, Kuehn EW. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351(2): 571-6.
- Cao Y, Zhou X, Huang X, Li Q, Gao L, Jiang L, et al. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. *PLoS One* 2013; 8(1): e53834.
- Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(27): 16976-84.
- Yoshida H, Teraoka M, Nishi N, Nakakita S, Nakamura T, Hirashima M, et al. X-ray

- structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *J Biol Chem* 2010; 285(47): 36969-76.
14. Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, Koelle DM, et al. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. *Nat Med* 2011; 17(8): 989-95.
  15. Ishikawa A, Imaizumi T, Yoshida H, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, et al. Double-stranded RNA enhances the expression of galectin-9 in vascular endothelial cells. *Immunol Cell Biol* 2004; 82(4): 410-4.
  16. Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, et al. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol* 2003; 170(7): 3631-6.
  17. Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, et al. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia* 2010; 24(4): 843-50.
  18. Kageshita T, Kashio Y, Yamauchi A, Seki M, Abedin MJ, Nishi N, et al. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer* 2002; 99(6): 809-16.
  19. Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(26): 10650-5.
  20. Piao YR, Piao LZ, Zhu LH, Jin ZH, Dong XZ. Prognostic value of T cell immunoglobulin mucin-3 in prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(6): 3897-901.
  21. Zhuang X, Zhang X, Xia X, Zhang C, Liang X, Gao L, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC. *Am J Clin Pathol* 2012; 137(6): 978-85.
  22. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(6): 708-17.
  23. Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M, Munn DH, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011; 117(17): 4501-10.
  24. Sehwat S, Reddy PB, Rajasagi N, Suryawanshi A, Hirashima M, Rouse BT. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog* 2010; 6(5): e1000882.

## Evaluating T-Cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3) Receptor in the Growth Inhibition of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cell Lines

Narges Zargar-Balajam<sup>1</sup>, Mahdi Shabani PhD<sup>2</sup>, Mansoreh Haghighi MSc<sup>3</sup>,  
Ahmad Ali Bayat MSc<sup>4</sup>, Mahmoud Aghaei PhD<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** T-cell immunoglobulin-mucin (TIM) is a cell-surface and transmembrane glycoprotein. TIM-3 plays a pivotal role in proliferation, invasion and metastasis of tumor cells. The present study was designed to evaluate the expressions of the TIM-3 and the role of the galectin-9, as TIM-3 ligand, in the regulation of cell proliferation in human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell lines.

**Methods:** The expression level of TIM-3 was examined in the Jurkat and KE-37 cell lines using real-time polymerase chain reaction method. MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] viability test was used to study the cell proliferation effect of galectin-9.

**Findings:** TIM-3 mRNAs were detected in the both Jurkat and KE-37 cell lines. The expression of TIM-3 in Jurkat cell line was higher than KE-37 cell line ( $P < 0.001$ ). The MTS assay revealed that galectin-9 reduced cells proliferation in a dose-dependent manner ( $> 1$  nM) in the both cell lines ( $P < 0.050$ ).

**Conclusion:** The present investigation introduced a possible mechanism for the control of acute lymphoblastic leukemia cell proliferation through TIM-3 and demonstrated that galectin-9 can inhibit the proliferation of Jurkat and KE-37 cell lines.

**Keywords:** T-cell immunoglobulin-mucin, Galectin-9, Acute lymphoblastic leukemia

**Citation:** Zargar-Balajam N, Shabani M, Haghighi M, Bayat AA, Aghaei M. **Evaluating T-Cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3) Receptor in the Growth Inhibition of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(345): 1250-60

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

2- Assistant Professor, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

3- PhD Student, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Mahmoud Aghaei PhD, Email: maghaei@pharm.mui.ac.ir

## بررسی سر می عوامل عفونی منتقل شونده از راه خون در داوطلبین اهدای خون با عوامل خطر کوچک در سازمان انتقال خون استان تهران: یک مطالعه هم گروهی

دکتر سید محمد میررضایی<sup>۱</sup>، دکتر حمید رضا صابر<sup>۲</sup>، دکتر فاطمه نادعلی<sup>۳</sup>، علی عباسیان<sup>۴</sup>،  
دکتر بشیر حاجی بیگی<sup>۵</sup>، دکتر سید روح اله میررضایی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** به منظور غربالگری و انتخاب اهداکنندگان سالم، چگونگی برخورد با داوطلبین دارای عوامل خطر و این که کدامیک و با چه عامل خطری، از اهدای خون معاف شود، از اهمیت خاصی برخوردار است.

**روش‌ها:** در یک مطالعه هم گروهی در فاصله‌ی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۴ نقش عوامل خطر کوچک (Minor) برای انتقال عفونت‌های Hepatitis B virus (HBV)، Hepatitis C virus (HCV) و Human immunodeficiency virus (HIV) در بین اهداکنندگان خون در استان تهران مورد ارزیابی قرار گرفت. مواجهه با عوامل خطر متوسط و بزرگ به عنوان معیار خروج از مطالعه در نظر گرفته شد. داده‌های مربوط به مطالعه، از بانک اطلاعاتی MAK-SYSTEM International Group استخراج گردید. نسبت شانس و میزان بروز در دو گروه بدون مواجهه و دارای مواجهه محاسبه شد. به منظور محاسبه‌ی میزان بروز در اهداکنندگان با اهدای تکراری، تعداد اهداکنندگان Seroconverter بر تعداد کل شخص-سال در معرض خطر تقسیم شد.

**یافته‌ها:** از ۱۹۰۴۴ نفر داوطلب اهدای خون وارد شده به مطالعه در سال ۱۳۸۴، ۱۰۶۹۶ نفر در گروه بدون مواجهه (بدون عامل خطر) و ۸۳۴۸ نفر در گروه دارای مواجهه با عامل خطر کوچک تا سال ۱۳۹۰ پی‌گیری شدند. نسبت شانس برای اهداکنندگان دارای مواجهه ۲/۷ و در زیرگروه‌های حجامت ۲/۹، دندان‌پزشکی ۱/۴، آندوسکوپی و بیوپسی ۱/۵ و تماس خانگی ۷/۸ به دست آمد. خطر نسبی محاسبه شده برای HBV در گروه دارای مواجهه و زیرگروه عامل خطر حجامت، به ترتیب ۶/۹ و ۹/۹ محاسبه شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اعمال معافیت در خصوص موارد مواجهه با عوامل خطر کوچک، به خصوص در مورد حجامت، امری ضروری است و هر گونه تغییر سیاست در پذیرش اهداکنندگان در کشورمان، تا زمان کاربرد روش‌های غربالگری دقیق‌تری همچون NAT (Nucleic acid-based tests) یا PCR (Polymerase chain reaction) و اعلام نتایج پژوهش‌های بعد از آن، شتاب‌زده خواهد بود.

**واژگان کلیدی:** اهداکننده‌ی واجد شرایط، عوامل خطر، عفونت‌های قابل انتقال از طریق خون

**ارجاع:** میررضایی سید محمد، صابر حمید رضا، نادعلی فاطمه، عباسیان علی، حاجی بیگی بشیر، میررضایی سید روح اله. **بررسی سر می عوامل عفونی منتقل شونده از راه خون در داوطلبین اهدای خون با عوامل خطر کوچک در سازمان انتقال خون استان تهران: یک مطالعه هم گروهی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۵): ۱۲۶۱-۱۲۷۱

۱- استادیار، مرکز تحقیقات علوم رفتاری و اجتماعی در سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

۲- پژوهشگر، مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه‌ی عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه‌ی عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران، تهران، ایران

۵- اداره کل پزشکی قانونی استان سمنان، شاهرود، ایران

## مقدمه

غربالگری و انتخاب اهداکنندگان خون، جزء اصلی‌ترین روش‌های تأمین سلامت خون‌های اهدایی می‌باشد (۱). طی فرایند غربالگری، داوطلبین دارای عوامل خطر برای بیماری‌های قابل انتقال از راه خون، از اهدای خون معاف می‌شوند (۲). از طرفی، معافیت اهداکنندگان از علل عمده‌ی از دست دادن منابع و کاهش فراهمی خون می‌باشد (۳). از این رو، چگونگی برخورد با اهداکنندگان دارای عوامل خطر و این که کدام اهداکننده و با چه عامل خطری از اهدای خون معاف شود، از اهمیت خاصی برخوردار است. بر این اساس، اهداکنندگان از نظر وجود عوامل خطر انتقال HBV، HIV Human immunodeficiency virus و Hepatitis B virus (Hepatitis C virus) (HCV) به چهار دسته‌ی اصلی فاقد خطر، خطر کم، متوسط و زیاد تقسیم می‌شوند.

گروه اول افراد بدون عامل خطر برای سرایت بیماری‌های قابل انتقال از راه تزریق خون بودند. گروه دوم، افراد دارای عوامل خطر کوچک (Minor) مثل اعمال جراحی کوچک، اعمال طبی و غیر طبی همراه با فرو بردن سوزن مانند طب سوزنی و خالکوبی و فرایندهای تشخیصی تهاجمی مثل آندوسکوپی با و بدون بیوپسی، اعمال دندانپزشکی، حجامت، تماس شغلی مثل کارکنان رسته‌ی بهداشتی - درمانی و تماس خانگی با افراد HIVAb، HBsAg و HCVAb مثبت بودند.

گروه سوم، افراد دارای عامل خطر متوسط بودند. این عوامل خطر شامل استفاده‌ی مرتب قبلی یا فعلی از مواد مخدر سبک مانند حشیش، داشتن رابطه‌ی جنسی ناهم جنس با یک شریک جنسی اتفاقی طی

یک سال گذشته یا با بیش از سه شریک جنسی شناخته شده، یا داشتن روابط جنسی فعلی یا قبلی با مصرف کنندگان مواد مخدر سنگین غیر تزریقی (کوکابین و اکستازی) بودند.

گروه چهارم، افراد دارای عامل خطر بزرگ بودند. به عنوان مثال، افراد دارای رابطه‌ی جنسی بدون محافظت با شریک جنسی مبتلا به HIV شناخته شده، یا با یک یا چند شریک جنسی تصادفی، مردان هم جنس گرا، افراد دارای رابطه‌ی جنسی با زنان روسپی، افراد مبتلا به عفونت‌های مقاربتی، افراد دریافت کننده‌ی خون طی یک سال گذشته و مصرف کنندگان مواد مخدر تزریقی در این گروه قرار می‌گرفتند (۴-۷).

در طب انتقال خون، اغلب بر حذف افراد دارای عامل خطر بزرگ از اهدای خون اتفاق نظر وجود دارد (۸، ۲)، اما پذیرش افراد دارای خطر کوچک، همواره مورد بحث بوده است (۹-۱۰). در کشورهای توسعه یافته، طی سال‌های اخیر، برخورد سهل‌تری با داوطلبین دارای عوامل خطر کوچک و حتی متوسط اعمال شده است که دلایل عمده‌ی آن، کنترل معیارهای خطر و کاهش شیوع بیماری‌های قابل انتقال از راه تزریق خون در جامعه و به خصوص در جمعیت اهداکنندگان و همچنین استفاده از آزمایش‌های غربالگری فوق‌العاده حساسی نظیر Polymerase chain reaction (PCR) و Nucleic acid- based test (NAT) در کنار نیاز روزافزون به خون بوده است (۱۱-۱۴).

به دنبال کاربرد این روش‌های غربالگری، عوامل خطر باقی مانده (Residual risk) برای سرایت بیماری‌های قابل انتقال از راه تزریق خون بسیار

HIVAb داشتند، دارای روابط جنسی بدون محافظ با شرکای جنسی متعدد بوده‌اند، اما در این جامعه، عامل خطر کوچکی مانند استفاده از ناخن‌گیر مشترک نیز ممکن است اهمیت زیادی داشته باشد (۱۶).

بر اساس دلایل پیش‌گفته (۱۴-۱۱) و مطالعات متعدد در جوامع توسعه یافته، چنین استنباط می‌شود که عوامل خطر کوچک و حتی متوسط در اهداکنندگان دارای اهمیت زیادی نیستند (۲۲-۱۹)؛ در حالی که در جوامع در حال توسعه، با شیوع متوسط و بالای این بیماری‌ها و عدم استفاده از آزمایش‌های مولکولی به عنوان روش غربال‌گری خون‌های اهدایی، عوامل خطر متوسط و کوچک ممکن است دارای اهمیت زیادی باشند (۱۷-۱۵).

در ایران تاکنون مطالعه‌ی آینده‌نگر در خصوص عوامل خطر کوچک مؤثر در انتقال عفونت‌های HIV، HBV و HCV در داوطلبین اهدای خون انجام نشده است. از این رو، در یک مطالعه‌ی هم‌گروهی با مدت زمان پی‌گیری ۷ ساله، این مواجهات و تأثیر آن‌ها در مثبت شدن نشانگرهای HIVAb، HCVAb و HBsAg در داوطلبین اهدای خون بررسی گردید.

### روش‌ها

در یک مطالعه‌ی هم‌گروهی در سال‌های ۹۰-۱۳۸۴، نقش عوامل خطر کوچک برای انتقال عفونت‌های HIV، HBV و HCV در بین اهداکنندگان خون در استان تهران، مورد ارزیابی قرار گرفت. کل اهداکنندگان مورد بررسی در این دوره‌ی زمانی، ۱۹۰۴۴ نفر در دو گروه بدون مواجهه (بدون عامل خطر) و دارای مواجهه با عامل خطر کوچک بودند که با جستجو در کلیه‌ی داوطلبین اهدای خون در

کاهش یافته است (۲). این در حالی است که جوامعی که دارای شیوع بالاتری از بیماری‌های پیش‌گفته هستند و یا نظارت و مراقبت‌های بهداشتی در آن‌ها در حدی نیست که منجر به کاهش موارد جدید این بیماری‌ها شود و همچنین، از روش‌های غربال‌گری مانند PCR و NAT استفاده نمی‌کنند، احتمال می‌رود شیوه‌ی برخورد متفاوت باشد.

مطالعات متعددی در خصوص مواجهه‌ی اهداکنندگان با عوامل خطر کوچک و متوسط در دنیا انجام شده است (۱۸-۱۵، ۱۲). در یک تحقیق چهار ساله، مشخص شد که در داوطلبین اهدای دارای عامل خطر متوسط، ۴ مورد جدید HIV مثبت و HCVAb مثبت بالاتری، در مقایسه با گروه افراد بدون عامل خطر، یافت شد؛ در حالی که در اهداکنندگان با عوامل خطر کوچک، هیچ مورد HIV مثبت در شروع مطالعه و در طی دوره‌ی پی‌گیری یافت نشد. از این مطالعه نتیجه‌گیری شد که باید اهداکنندگان با عامل خطر متوسط، از اهدای خون معاف شوند (۱۲).

در زمینه‌ی مواجهه با عوامل خطر و میزان وقوع هپاتیت C اکتسابی از جامعه نیز یک مطالعه‌ی هم‌گروهی در کشور ایتالیا صورت گرفت که در نتیجه‌ی آن، مشخص شد که موارد جدید هپاتیت C در افراد مواجهه یافته با عوامل خطر کوچک و متوسط، با احتمال فراوان ممکن است از طریق مواجهات درمانی رخ داده باشد (۱۵).

همچنین، در تحقیق دیگری در ساحل عاج در خصوص عوامل خطر در اهداکنندگان داوطلب تکراری، مشاهده شد که هر چند درصد زیادی از اهداکنندگان داوطلب که تغییر سرمی مثبت برای



سال ۱۳۸۴ وارد مطالعه شدند. در این پژوهش، مواجهه با عوامل خطر متوسط و بزرگ به عنوان معیار خروج از مطالعه برای داوطلبین اهدا در نظر گرفته شد.

داده‌های مربوط به مطالعه از بانک اطلاعاتی MAK-SYSTEM International Group استخراج گردید. برای به دست آوردن اطلاعات مربوط به اهداکنندگان دارای عوامل خطر کوچک، با استفاده از کلمات کلیدی حجامت، جراحی کوچک، اعمال دندان پزشکی، خالکوبی، آندوسکوپی با بدون بیوپسی، تماس خانگی و تماس شغلی در بانک اطلاعاتی MAK-SYSTEM International Group جستجو انجام گردید. همچنین، داده‌های مربوط به اهداهای تکراری با جستجو در تمام سال‌های مطالعه و بر اساس شماره‌ی پرونده‌ی انحصاری هر اهداکننده در این بانک اطلاعاتی مورد جستجو قرار گرفت.

کلیه‌ی نمونه‌ها طبق روال معمول در انتقال خون، در مرحله‌ی قبل از اهدا و بر اساس راهنمای انتخاب اهداکنندگان خون ایران و در محیطی خصوصی و با حضور پزشک دوره دیده، به منظور انطباق با شرایط اهدای خون مورد مشاوره قرار گرفتند (۲۳). بر اساس این مشاوره، داوطلبان در دو گروه بدون مواجهه و دارای مواجهه طبقه‌بندی شدند. گروه فاقد عامل خطر کوچک در صورت داشتن همه‌ی ضوابط مورد نیاز برای اهدای خون موفق به اهدا گردیدند. برای داوطلبین واجد عامل خطر کوچک بر اساس نوع عامل خطر حداکثر تا ۱۲ ماه معافیت از اهدا در نظر گرفته شد. این داوطلبین، پس از سپری شدن دوره‌ی معافیت، بار دیگر به عنوان اهداکننده پذیرفته می‌شدند. از همه‌ی اهداکنندگان پس از پذیرش و اهدای

خون، نمونه‌هایی برای بررسی عفونت‌های سیفلیس، هپاتیت B و C و HIV گرفته شد. آزمایش‌ها با روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) نسل سوم و با استفاده از کیت‌های معتبر انجام شد؛ نتایج مثبت ابتدایی، به منظور اثبات عفونت با روش Western blot و Immunoblot به ترتیب برای HIV و HCV و همچنین آزمایش‌های خنثی‌سازی (Neutralization test) برای HBS Ag مورد تأیید قرار گرفت (۲۴).

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج آزمایشگاهی اهداکنندگان شامل HBsAg، HCVAb و HIVAb در دو گروه بدون مواجهه و دارای مواجهه تا به دست آمدن اولین پاسخ مثبت مورد پی‌گیری قرار گرفت. نتایج مثبت این آزمایش‌ها در اولین اهدای هر داوطلب (مثبت اولیه) به منظور تعیین نسبت شانس و در اهداهای بعدی (Seroconversion) جهت تعیین بروز، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور محاسبه‌ی میزان بروز HIV، HCV و HBV در اهداکنندگان با اهدای تکراری، تعداد اهداکنندگان Seroconverter بر تعداد کل شخص - سال در معرض خطر، تقسیم شد. تعداد شخص - سال در معرض خطر، به وسیله‌ی تعداد اهداهای اهداکنندگان با اهدای تکراری ضرب در یک تخمین از میانگین فاصله‌ی بین اهداهای اهداکنندگان با اهدای تکراری (IDI یا Inter donation Interval) در طی سال‌های مطالعه به دست آمد (۲۷-۲۵).

میانگین فاصله‌ی بین اهداهای اهداکنندگان با اهدای تکراری، با توجه به میانگین ۱۰ اهدا در مدت ۷ سال مطالعه  $(1/4 = 7 \div 10)$ ،  $261 \text{ روز} = 1/4 \div 365$ ، معادل ۳۷ هفته محاسبه شد.

عامل خطر) و ۸۳۴۸ نفر در گروه دارای مواجهه (با عامل خطر کوچک) تا سال ۱۳۹۰ به مدت ۷ سال پی گیری شدند. ۸/۹۰ درصد موارد مرد و به ترتیب ۷/۴۹، ۵/۱۵ و ۸/۳۴ درصد موارد، اهداکننده‌ی بار اول، با سابقه و مستمر بودند. خصوصیات اپیدمیولوژیک این گروه‌ها در جدول ۱ آمده است.

## یافته‌ها

از ۱۹۹۳۵ اهداکننده‌ی اولیه‌ی وارد شده به مطالعه، ۸۹۱ نفر به دلایل دیگری (به جز بیماری‌های قابل انتقال از طریق خون) از اهدای خون معاف و از مطالعه حذف شدند. بنابراین، از ۱۹۰۴۴ نفر داوطلب اهدای خون وارد شده به مطالعه در سال ۱۳۸۴، ۱۰۶۹۶ نفر در گروه بدون مواجهه (بدون

جدول ۱. خصوصیات اپیدمیولوژیک شرکت کنندگان در مطالعه

مقدار P	دارای مواجهه با عوامل خطر کوچک فراوانی (درصد)	بدون مواجهه فراوانی (درصد)	خصوصیات
۰/۰۰۱	۱۰۷۷ (۱۲/۹)	۷۱۶ (۶/۷)	جنس
۰/۰۰۱	۷۲۷۱ (۸۷/۱)	۹۹۸۰ (۹۳/۳)	مرد
۰/۰۰۱	۲۱۷۱ (۲۶/۰)	۳۲۵۱ (۳۰/۴)	گروه‌های سنی
۰/۰۰۱	۳۲۵۵ (۳۹/۰)	۳۳۲۶ (۳۱/۱)	۱۸-۲۵ سال
۰/۰۰۱	۲۳۶۳ (۲۸/۳)	۲۴۶۰ (۲۳/۰)	۲۶-۳۵ سال
۰/۰۰۱	۳۵۹ (۴/۳)	۱۳۸۰ (۱۲/۹)	۳۶-۴۵ سال
۰/۰۰۱	۲۰۰ (۲/۴)	۲۷۹ (۲/۶)	۴۶-۵۵ سال
> ۰/۰۵۰	۴۳۲۴ (۵۱/۸)	۵۱۳۴ (۴۸/۰)	۵۶-۶۵ سال
۰/۰۰۱	۱۳۳۶ (۱۶/۰)	۱۶۰۴ (۱۵/۰)	نوع اهداکننده
> ۰/۰۵۰	۲۶۸۸ (۳۲/۲)	۳۹۵۸ (۳۷/۰)	بار اول*
۰/۰۰۱	۳۶۸۱ (۴۴/۱)	۳۸۵۱ (۳۶/۰)	با سابقه †
۰/۰۱۰	۲۱۷ (۲/۶)	۲۵۷ (۲/۴)	مستمر §
> ۰/۰۵۰	۶۷۶ (۸/۱)	۴۲۸ (۴/۰)	شغل
۰/۰۰۱	۲۵۰۴ (۳۰/۰)	۴۳۸۵ (۴۱/۰)	آزاد
> ۰/۰۵۰	۴۱۷ (۵/۰)	۶۹۵ (۶/۵)	بازنشسته
> ۰/۰۵۰	۳۶۱ (۴/۳)	۳۶۴ (۳/۴)	خانه‌دار
> ۰/۰۵۰	۱۴۲ (۱/۷)	۲۶۷ (۲/۵)	کارمند
> ۰/۰۵۰	۳۵۰ (۴/۲)	۴۴۹ (۴/۲)	دانشجو
۰/۰۱۰	۲۵۹ (۳/۱)	۸۶ (۰/۸)	کارگر
۰/۰۰۱	۲۷۰۵ (۳۲/۴)	۲۵۶۷ (۲۴/۰)	نظامی
> ۰/۰۵۰	۳۲۹۰ (۳۹/۴)	۴۳۸۵ (۴۱/۰)	سایر
۰/۰۰۱	۱۸۹۵ (۲۲/۷)	۳۶۳۶ (۳۴/۰)	تحصیلات
> ۰/۰۵۰	۱۹۹ (۲/۴)	۲۲ (۰/۲)	بی‌سواد
			زیر دیپلم
			دیپلم
			دانشگاهی
			نامشخص

\* اهداکننده‌ی بار اول به اهداکننده‌ای گفته می‌شود که بر اساس اطلاعات ذخیره شده در پایگاه انتقال خون تهران، فاقد سابقه‌ی اهدا باشد.  
† با سابقه‌ی اهداکننده‌ی با سابقه، به افرادی اطلاق می‌شود که از آخرین نوبت اهدا توسط آنان بیش از یک سال گذشته باشد.  
§ اهداکننده‌ی مستمر نیز اهداکننده‌ای است که طی سال گذشته حداقل ۲ نوبت اهدا داشته است.

جدول ۲. نتایج آزمایش‌های سرولوژیک انجام شده بر روی شرکت کنندگان به تفکیک گروه‌های دارای مواجهه و بدون مواجهه

متغیرها	اهداکنندگان با اهدای تکراری	فراوانی	HIV تعداد (میزان در ۱۰ <sup>۵</sup> و حدود اطمینان ۹۵٪)	HCV تعداد (میزان در ۱۰ <sup>۵</sup> و حدود اطمینان ۹۵٪)	HBV تعداد (میزان در ۱۰ <sup>۵</sup> و حدود اطمینان ۹۵٪)
مواجهه	بدون مواجهه	۱۰۶۹۶	۰	۰	۲۰ (۱۹۰: ۲۹۰-۱۲۰)
	دارای مواجهه با عوامل خطر کوچک*	۸۳۴۸	۰	۲ (۶-۹۶: ۲۴)	۴۲ (۵۰۳: ۶۸۰-۳۷۲)
زیر گروه	حجامت ۴	۵۸۴۳	۰	۱ (۱۷: ۱۲۱-۲)	۳۱ (۵۳۰: ۷۵۳-۳۷۳)
	اعمال دندان پزشکی	۳۹۵	۰	۰	۱ (۲۵۳: ۱۶۹۳-۳۵)
	آندوسکوپی با و بدون بیوپسی	۷۰۵	۰	۰	۲ (۲۸۳: ۱۱۳۲-۷۱)
	خالکوبی	۵۸۵	۰	۰	۰
	جراحی کوچک	۲۶۲	۰	۰	۰
	تماس خانگی	۵۵۰	۰	۱ (۱۸۱: ۱۲۸۸-۲۶)	۸ (۱۴۵۵: ۲۸۹۳-۷۳۱)
	تماس شغلی	۸	۰	۰	۰

\*: نسبت شانس برای اهداکنندگان بدون مواجهه (بدون عامل خطر) و دارای مواجهه (دارای عامل خطر کوچک): ۲/۷ (۴/۲۶-۱/۵۸ حدود اطمینان ۹۵٪)  
 †: نسبت شانس برای اهداکنندگان بدون مواجهه (بدون عامل خطر) و دارای مواجهه (دارای عامل خطر کوچک): ۲/۹ (۵/۱۰-۲/۸۰ حدود اطمینان ۹۵٪)  
 دندان پزشکی: ۱/۴ (۱۰/۵۰-۱/۳۰ حدود اطمینان ۹۵٪؛ آندوسکوپی با یا بدون بیوپسی: ۱/۵ (۶/۴۰-۱/۲۰ حدود اطمینان ۹۵٪؛ تماس خانگی: ۷/۸ (۲۴/۵۰-۲/۷۰ حدود اطمینان ۹۵٪)

HIV: Human immunodeficiency virus; HCV: Hepatitis C virus; HBV: Hepatitis B virus

## بحث

مطالعه‌ی حاضر، اولین مطالعه‌ی آینده‌نگر برای گزارش مواجهه با عوامل خطر کوچک در اهداکنندگان در ایران است و می‌توان از آن، به عنوان اولین مطالعه‌ی انجام گرفته به منظور تخمین خطر نسبی برای عامل خطر حجامت در داوطلبین اهدای خون در دنیا نام برد.

در این مطالعه، با ارزیابی رفتارهای در معرض عوامل خطر کوچک در یک هم‌گروه بزرگ از اهداکنندگان، مشخص شد که بروز HIV در این گونه عوامل خطر صفر است؛ در حالی که HBV و HCV در مواردی که حجامت به عنوان عامل خطر مورد بررسی قرار گرفت، بروز قابل توجهی نشان داد. در این موارد، یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، مشابه مطالعات Lackritz و همکاران (۸) و Silvani و همکاران (۱۲) می‌باشد.

در آزمایش‌های انجام شده برای داوطلبین اهدا در گروه‌های مورد بررسی (بدون مواجهه و دارای مواجهه)، در بدو مطالعه و در تمام مدت پی‌گیری، هیچ موردی از عفونت HIV یافت نشد. نتایج آزمایش‌های سرولوژیک انجام شده بر روی شرکت کنندگان به تفکیک گروه‌های دارای مواجهه و بدون مواجهه در جدول ۲ آمده است.

در طی مدت ۷ سال پی‌گیری، تعداد ۷ مورد عفونت جدید (۶ هپاتیت B و ۱ هپاتیت C) رخ داد. در واقع، این تعداد نمایانگر Seroconversion در اهداکنندگان تکراری است. جدول ۳، میزان بروز عفونت‌های HBV، HCV و HIV در اهداکنندگان تکراری را نشان می‌دهد. خطر نسبی محاسبه شده برای HBV در گروه دارای مواجهه و زیر گروه عامل خطر حجامت به ترتیب ۶/۹ (۵۸/۵-۱/۲۳ حدود اطمینان ۹۵ درصد) و ۹/۹ (۸۵-۱/۱۷ حدود اطمینان ۹۵ درصد) محاسبه شد.

جدول ۳. بروز HIV، HCV و HBV (سروکانورسیون) در اهداکنندگان تکراری

متغیرها	اهداکنندگان با اهدای تکراری	فراوانی	تعداد اهدای تکراری	بروز	بروز	بروز
				(سروکانورسیون) HIV در ۱۰ <sup>۵</sup>	(سروکانورسیون) HCV در ۱۰ <sup>۵</sup>	(سروکانورسیون) HBV در ۱۰ <sup>۵</sup>
				تعداد (میزان یا Rate ratio و حدود اطمینان ۹۵٪)	تعداد (میزان یا Rate ratio و حدود اطمینان ۹۵٪)	تعداد (میزان یا Rate ratio و حدود اطمینان ۹۵٪)
مواجهه	بدون مواجهه	۱۰۶۹۶	۱۶۰۶۴	۰	۰	۱ (۶:۴۴-۰/۹)
	دارای مواجهه با عوامل خطر کوچک	۸۳۴۸	۱۱۶۸۷	۰	۱ (۶/۶:۶۱-۱/۲)	۵ (۴۳:۱۰۳-۱۸)
زیر گروه	حجامت	۵۸۴۳	۸۱۸۰	۰	۱ (۱۲:۸۷-۱/۷)	۵ (۶۱:۱۴۷-۲۵)
	اعمال دندان پزشکی	۳۹۵	۵۵۳	۰	۰	۰
	آندوسکوپی با یا بدون	۷۰۵	۹۸۷	۰	۰	۰
	خالکوبی	۵۸۵	۸۱۹	۰	۰	۰
	جراحی کوچک	۲۶۲	۳۶۷	۰	۰	۰
	تماس خانگی	۵۵۰	۷۷۰	۰	۰	۰
	تماس شغلی	۸	۱۱	۰	۰	۰

HIV: Human immunodeficiency virus; HCV: Hepatitis C virus; HBV: Hepatitis B virus

در اهداکنندگان دارای مواجهه، ۲/۷ به دست آمد و هنگامی که در این گروه از اهداکنندگان نسبت شانس برای زیر گروه‌های عوامل خطر مورد مطالعه محاسبه شد، بالاترین نسبت شانس برای تماس خانگی و کمترین نسبت شانس برای اعمال دندان پزشکی به دست آمد که این نتایج، در مطالعات مشابهی تأیید شده است (۱۷-۱۸). اگر چه نسبت شانس به دست آمده با توجه به شیوع پایین هپاتیت B در گروه داوطلبین اهدای خون، ممکن است در حجم نمونه‌های بالاتر تفاوت‌هایی نشان دهد؛ که این مسأله با توجه به فواصل اطمینان به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر نیز مشهود می‌باشد. همخوانی این یافته‌ها با اطلاعات به دست آمده از سایر مطالعات، نقش اثرگذار مواجهات مورد بررسی را در این پیامدها تقویت می‌کند.

علاوه بر میزان بالاتر عفونت‌های قابل انتقال از راه خون شامل HBV و HCV در موارد مواجهه با عوامل خطر کوچک، تفاوت معنی‌داری در مختصات اپیدمیولوژیک اهداکنندگان به دست آمد؛ به نحوی که درصد زنان به عنوان اهداکننده در گروه در معرض مواجهه، افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. همچنین، افزایش میزان تحصیلات، رابطه‌ی معکوسی با حضور مواجهه در اهداکنندگان نشان داد که این دو یافته‌ی اخیر، مشابه مطالعه‌ی Silvani و همکاران است (۱۲). بر این اساس، اهداکنندگان در گروه مواجهه بیشتر از گروه سنی ۱۸-۳۵ سال، دارندگان مشاغل آزاد و سطح تحصیلات پایین‌تر بودند. همین نتیجه در مطالعات دیگری نیز به دست آمده است (۱۱-۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، نسبت شانس برای هپاتیت B

در این مطالعه، شامل اعمال دندان پزشکی، آندوسکوپي با یا بدون بیوپسی، خالکوبی و جراحی های کوچک مطرح هستند. بروز در این مواجهات و برای هر سه نشانگر مورد بررسی (HIVAb, HCVAb, HBsAg) صفر است که با وجود حجم نمونه‌ی به نسبت کم مورد بررسی، نتایج از عدم خطر بالقوه‌ی این عوامل خطر حکایت دارد و این در حالی است که نسبت شانس HBsAg مثبت برای اعمال دندان پزشکی و آندوسکوپي با یا بدون بیوپسی به ترتیب  $1/4$  و  $1/5$  به دست آمد.

در مطالعه‌ی انجام شده در مراکش در اهداکنندگان، مواجهه با درمان های دندان پزشکی و آندوسکوپي به عنوان عامل خطر کسب عفونت HBV به ترتیب نسبت شانس  $3/8$  و  $0/3$  را نشان داد (۱۷). نسبت شانس  $1/5$  برای آندوسکوپي با یا بدون بیوپسی در کنار بروز صفر این نشانگرها، شاید به دلیل نیاز بیشتر بیماران مبتلا به بیماری های کبدی به انجام آندوسکوپي قابل توجه است. همچنین، نسبت شانس و بروز صفر برای خالکوبی و جراحی های کوچک در مطالعه‌ی حاضر متفاوت از نتایج مطالعه‌ی انجام شده در مراکش (۱۷) و یمن (۱۸) است که در آنها، نسبت شانس بالاتر از ۱ برای خالکوبی و جراحی های کوچک گزارش شده است.

در نهایت، با نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر به نظر می‌رسد تا زمانی که در کشورمان روش های تشخیصی دقیق تری همانند NAT و PCR به طور معمول و به عنوان آزمون غربال گری برای داوطلبین اهدای خون مورد استفاده قرار نگرفته است، اعمال معافیت در خصوص موارد مواجهه با عوامل

مقایسه‌ی نسبت شانس به دست آمده در گروه دارای مواجهه با میزان بروز در همان گروه‌ها، واقعیت را بهتر نشان می‌دهد؛ به طوری که در تماس های خانگی که با یک نسبت شانس  $7/8$  روبه‌رو هستیم، در مدت ۷ سال پی گیری اهداکنندگان، حتی یک مورد Serocconversion رخ نداده است و از آن جایی که بیشترین تعداد HBsAg مثبت در تماس های خانگی در ابتدای مطالعه در گروه سنی ۳۵-۵۵ سال به دست آمد، این نسبت شانس بالا در کنار خطر نسبی صفر به دست آمده، بیش از آن که به انتقال HBV در تماس های خانگی اشاره داشته باشد، به روش انتقال آن در کشورمان مربوط به سال های قبل از واکسیناسیون همگانی علیه HBV، یعنی انتقال مادر به کودک (Vertical transmission) اشاره دارد (۲۸). سایر مطالعات نیز نتایج مشابهی را گزارش نموده‌اند (۲۹-۳۰).

از طرفی، نسبت شانس  $2/9$  برای حجامت با خطر نسبی  $9/9$  در همین گروه از مواجهه یافتگان همراه است که نشان از همراهی یک عامل خطر بالقوه برای مثبت شدن HBsAg دارد. این نتیجه با نتایج مطالعه‌ی Al-Waleedi و Khader در یمن مطابقت دارد، گرچه در آن مطالعه، فقط نسبت شانس مرتبط با حجامت گزارش شده است (۱۸). در گروه مواجهه کننده با حجامت با HCVAb مثبت نیز، اگر چه نسبت شانس و خطر نسبی برای آنها محاسبه نشده است، اما همراهی بسیار قوی با این عامل خطر نشان می‌دهد. این نتیجه در سایر مطالعات به این دلیل که عامل خطر حجامت به اندازه‌ی کافی مورد بررسی قرار نگرفته است، فاقد گزارش از جهت مقایسه است. از سوی دیگر، عوامل خطر کوچک مورد بررسی

## تشریح و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاران و کارکنان انتقال خون استان تهران سپاسگزاری نمایند.

خطر کوچک به خصوص در مورد حجامت امری ضروری و خدشه ناپذیر باشد. در پایان، متذکر می‌شود انجام این گونه مطالعات با حجم نمونه‌های بیشتر و مدت پی‌گیری طولانی‌تر، می‌تواند به دستیابی داده‌های معتبرتری منجر گردد.

## References

1. Klein HG. Will blood transfusion ever be safe enough? *JAMA* 2000; 284(2): 238-40.
2. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334(26): 1685-90.
3. Zou S, Musavi F, Notari EP, Rios JA, Trouern-Trend J, Fang CT. Donor deferral and resulting donor loss at the American Red Cross Blood Services, 2001 through 2006. *Transfusion* 2008; 48(12): 2531-9.
4. Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report 1997; 9(2): 15-26.
5. Campostrini S. An index of HIV infection risk in the population. *Epidemiol Prev* 1994; 18(60): 151-6. [In Italian].
6. Johnson AM, Wadsworth J, Wellings K, Bradshaw S, Field J. Sexual lifestyles and HIV risk. *Nature* 1992; 360(6403): 410-2.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Human immunodeficiency virus transmission in household settings--United States. *JAMA* 1994; 271(24): 1897-9.
8. Lackritz EM, Satten GA, Aberle-Grasse J, Dodd RY, Raimondi VP, Janssen RS, et al. Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. *N Engl J Med* 1995; 333(26): 1721-5.
9. Galea G. The role of personal interviews by direct questioning on blood donors with particular reference to prevention of transfusion-related infections: a Scottish perspective. *Transfus Med* 1997; 7(1): 13-7.
10. Marwick C. Will more donor questions make blood safer? *JAMA* 1991; 265(7): 838-9.
11. Zou S, Musavi F, Notari EP, Fujii KE, Dodd RY. Prevalence of selected viral infections among temporarily deferred donors who returned to donate blood: American Red Cross blood donor study. *Transfusion* 2005; 45(10): 1593-600.
12. Silvani C, Vianello L, Rebulli P, Prati D, Mozzi F, Taioli E, et al. Blood donors with 'medium' or 'minor' risk factors for human immunodeficiency virus infection: are they eligible for donation? *Haematologica* 2000; 85(10): 1055-9.
13. Maynard J, Manchester K, Young CT. The effect of the first tattoo variance on our blood supply. *Transfusion* 2003; 43(Suppl): 73A.
14. Nishioka SA, Gyorkos TW, Joseph L, Collet JP, Maclean JD. Tattooing and risk for transfusion-transmitted diseases: the role of the type, number and design of the tattoos, and the conditions in which they were performed. *Epidemiol Infect* 2002; 128(1): 63-71.
15. Prati D, Capelli C, Silvani C, De Mattei C, Bosoni P, Pappalettera M, et al. The incidence and risk factors of community-acquired hepatitis C in a cohort of Italian blood donors. *Hepatology* 1997; 25(3): 702-4.
16. Goldman M, Xi G, Yi QL, Fan W, O'Brien SF. Reassessment of deferrals for tattooing and piercing. *Transfusion* 2009; 49(4): 648-54.
17. Baha W, Foullos A, Dersi N, They-they TP, El aK, Nourichafi N, et al. Prevalence and risk factors of hepatitis B and C virus infections among the general population and blood donors in Morocco. *BMC Public Health* 2013; 13: 50.
18. Al-Waleedi AA, Khader YS. Prevalence of hepatitis B and C infections and associated factors among blood donors in Aden City, Yemen. *East Mediterr Health J* 2012; 18(6): 624-9.
19. Food and Drug Administration. Revised recommendations for the prevention of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by blood and blood products. Bethesda, MD: FDA; 1992.
20. de Nishioka SA, Gyorkos TW, Joseph L, Collet JP, Maclean JD. Tattooing and risk for transfusion-transmitted diseases: the role of the type, number and design of the tattoos, and the conditions in which they were performed. *Epidemiol Infect* 2002; 128(1): 63-71.

21. de Nishioka SA, Gyorkos TW, Joseph L, Collet JP, MacLean JD. Tattooing and transfusion-transmitted diseases in Brazil: a hospital-based cross-sectional matched study. *Eur J Epidemiol* 2003; 18(5): 441-9.
22. Friday JL. Standards for blood banks and transfusion services. 22<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2003.
23. Mirrezaie SM, Saber HR, Hajibeigi B, Salekmoghaddam E, Abbasian A, Alavian SM. Impact of HBV vaccination on prevalence of Hepatitis B Virus infection among volunteer blood donors in Tehran-Iran. *Shiraz E-Med J* 2014; 15(2): e18066.
24. Saber HR, Mirrezaie SM, Hajibaygi B, Abasian A, Salek Moghadam E, Alavian SM, et al. HIV and HCV incidence estimation in first time blood donors in Tehran blood transfusion center. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2012; 9(3): 308-14. [In Persian].
25. Glynn SA, Kleinman SH, Wright DJ, Busch MP. International application of the incidence rate/window period model. *Transfusion* 2002; 42(8): 966-72.
26. Soldan K, Barbara JA, Ramsay ME, Hall AJ. Estimation of the risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infectious donations entering the blood supply in England, 1993-2001. *Vox Sang* 2003; 84(4): 274-86.
27. Korelitz JJ, Busch MP, Kleinman SH, Williams AE, Gilcher RO, Ownby HE, et al. A method for estimating hepatitis B virus incidence rates in volunteer blood donors. *National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study. Transfusion* 1997; 37(6): 634-40.
28. Zali MR, Mohammad K, Noorbala AA, Noorimayer B, Shahrzad S. Rate of hepatitis B seropositivity following mass vaccination in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2005; 11(1-2): 62-7.
29. Mansour-Ghanaei F, Joukar F, Yaseri M, Soati F, Atrkar-Roushan Z. Intrafamilial spread of hepatitis B virus in Guilan Province-North of Iran. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2013; 4(4): 250-7.
30. Adibi P. Why we still need HBV population-based epidemiologic studies. *Hepat Mon* 2012; 12(2): 71-2.

## Exposure with Minor Risk Factors among Blood Donors in Tehran Province, Iran: A Cohort Study

Seyed Mohammad Mirrezaie MD<sup>1</sup>, Hamid Reza Saber MD<sup>2</sup>, Fatemeh Nadali PhD<sup>3</sup>,  
Ali Abbasian<sup>4</sup>, Bashir Hajibeigi MD<sup>4</sup>, Seyed Roohallah Mirrezaie MD<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** For screening and selecting healthy volunteer blood donors, it is important how to face with the minor risk factors.

**Methods:** In a cohort study during the 2005-2011, minor risk factors for transmission of hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) among blood donors in Tehran, Iran, were evaluated. Data for the study were obtained from the database of MAK-SYSTEM International Group. Odds ratio and relative risk were calculated. To calculate the incidence among repeated donors, the number of seroconverters was divided to person-years at risk.

**Findings:** From 19,044 blood donor volunteers entered the study in 2005, 10,696 people were in the unexposed group (no risk) and 8,348 in exposed group to the minor risk factors. They were followed until 2011. The odds ratio was 2.7 for donors exposed group and 2.9 in cupping, 1.4 in dentistry, 1.5 in endoscopic plus biopsy, and 7.8 in household subgroups. Calculated relative risk for HBV was 6.9 in exposed group to the minor risk factors and 9.9 in cupping subgroup.

**Conclusion:** The results of this study show while in the country, more accurate screening tests such as nucleic acid-based tests (NAT) or polymerase chain reaction (PCR) methods has not been used routinely for blood donors, deferral strategy applying in cases of exposure to minor risk factors, especially in the cupping exposed cases, is essential.

**Keywords:** Eligible blood donor, Risk factors, Minor risk factors, Blood born infections

**Citation:** Mirrezaie SM, Saber HR, Nadali F, Abbasian A, Hajibeigi B, Mirrezaie SR. **Exposure with Minor Risk Factors among Blood Donors in Tehran Province, Iran: A Cohort Study.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(345): 1261-71

1- Assistant Professor, Center for Health-Related Social and Behavioral Sciences Research, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

2- Researcher, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine AND Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center, Tehran, Iran

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

4- Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine AND Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center, Tehran, Iran

5- Legal Medicine Organization, Semnan Province, Shahrood, Iran

**Corresponding Author:** Seyed Mohammad Mirrezaie MD, Email: mirrezaie@shmu.ac.ir



## بررسی تأثیر تفاوت زمان اثردهی داروی دوستاکسل در افزایش میزان مرگ سلول‌های تومور پستان رده‌ی MCF-۷ در محیط برون‌تنی

علی ابراهیمی فرد<sup>۱</sup>، دکتر محمدباقر توکلی<sup>۲</sup>، دکتر حسین صالحی<sup>۳</sup>، دکتر حمید امامی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** شیمی‌درمانی یکی از پرکاربردترین روش‌های درمان سرطان‌ها می‌باشد. مهم‌ترین مرحله‌ی درمان، انتخاب مؤثرترین دارو برای ایجاد بیشترین اثر سمیت بر سلول‌های سرطانی است. دوستاکسل دارویی است که هنگام استفاده‌ی ترکیبی با رادیوتراپی می‌تواند اثرات درمانی چشم‌گیری نظیر متوقف کردن چرخه‌ی سلولی در فاز G<sub>2</sub>/M، که مرحله‌ای بسیار آسیب‌پذیر به تابش‌های یونیزان است، داشته باشد. مدت زمان اثردهی دارو با سلول یکی از عواملی است که اثر آن تاکنون در مطالعات سلولی این دارو به عنوان یک عامل متغیر مورد بررسی قرار نگرفته است. در این مطالعه‌ی تجربی، ما به بررسی تأثیر تفاوت زمان اثردهی داروی دوستاکسل در افزایش میزان مرگ سلول‌های سرطانی پستان رده‌ی MCF-۷ در محیط برون‌تنی پرداختیم.

**روش‌ها:** در این مطالعه، سلول‌ها را به سه گروه شاهد، ۱ با مدت زمان اثردهی ۵ ساعت و ۲ با مدت زمان اثردهی ۲۴ ساعت در غلظت‌های مختلف داروی دوستاکسل تقسیم کردیم. میزان حیات سلولی از طریق آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] در سه بازه‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آزمایش سنجیده شد.

**یافته‌ها:** میزان مرگ سلولی، وابسته به غلظت دارو بود. در مقایسه بین دو گروه ۱ و ۲، کاهش معنی‌داری در حیات سلولی، به ویژه در غلظت‌های بالا مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی تأثیر مدت زمان اثردهی بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه‌ی ما اثبات کرد که مدت زمان اثردهی داروی دوستاکسل عاملی مهم در میزان مرگ سلولی است و هنگام کاربرد هم‌زمان دوستاکسل با رادیوتراپی در مطالعات سلولی، باید به عنوان یک عامل متغیر مورد توجه قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** سرطان پستان، شیمی‌درمانی، دوستاکسل، رده‌ی سلولی MCF-۷

**ارجاع:** ابراهیمی فرد علی، توکلی محمدباقر، صالحی حسین، امامی حمید. بررسی تأثیر تفاوت زمان اثردهی داروی دوستاکسل در افزایش

میزان مرگ سلول‌های تومور پستان رده‌ی MCF-۷ در محیط برون‌تنی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۵): ۱۲۸۰-۱۲۷۲

### مقدمه

به شمار می‌رود (۱). درمان‌های مختلفی نظیر جراحی، شیمی‌درمانی، هورمون‌تراپی و رادیوتراپی برای این سرطان وجود دارد که انتخاب هر روش، بستگی به نوع و مرحله‌ی بیماری دارد (۲). در

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان ایرانی و سراسر جهان است و هنوز هم یک مشکل بزرگ سلامت در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته

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

۲- استاد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۴- استادیار، گروه آنکولوژی و رادیوتراپی، بیمارستان سیدالشهدا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mb.tava20001956@gmail.com

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمدباقر توکلی

سال‌های اخیر، درمان‌های هم‌زمان مانند جراحی همراه با رادیوتراپی و شیمی‌درمانی همراه با رادیوتراپی نیز مطرح گردیده است (۳).

یکی از درمان‌هایی که به تازگی در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از داروهای گروه تاکسان (Taxan) می‌باشد. دسته داروهای رده‌ی تاکسان مانند پکلی تاکسل (Paclitaxel) و دوستاکسل (Docetaxel)، داروهای ضد سرطانی هستند که اثرات خود را از طریق آسیب درون سلولی اعمال می‌کنند (۴). دوستاکسل دارویی است که اثرات ضد سرطانی خود را با تخریب میکروتوبول‌های درون سلولی نشان می‌دهد. میکروتوبول‌ها، پلی‌مرهایی از جنس پروتئین و مسؤل ایجاد تفاوت در شکل و حرکت سلولی می‌باشند (۵). بیشترین ترکیب میکروتوبول‌ها، پلیمر توبولین متشکل از یک پروتئین است که از دو زیرواحد غیر مشابه  $\alpha$  و  $\beta$  تشکیل شده است. در واقع با اتصال زیرواحد غیر مشابه  $\alpha$  و  $\beta$ ، دایمر تولید می‌شود و با اتصال دایمرها، میکروتوبول ایجاد می‌گردد (۶).

از داروهای بازدارنده‌ی میکروتوبول که در تقسیم میوتیک نقش دارند، در درمان بسیاری از تومورها از جمله سرطان متاستاتیک پستان و متوقف کردن حرکات میکروتوبول استفاده می‌شود. این داروها به دو روش «ممانعت از اتصال و تشکیل پلیمر (Polymerization) هر یک از دایمرهای توبولین» و «ممانعت از جدا شدن دایمرهای از قبل تشکیل شده (Depolymerization)» (۷) باعث از بین رفتن تقسیم سلولی و ممانعت از رشد سلول می‌شوند (۸).

داروهای گروه تاکسان مانند پکلی تاکسل و دوستاکسل، به عنوان داروهای بازدارنده‌ی

میکروتوبول، در درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان استفاده می‌گردد (۹). این داروها تعادل میکروتوبول‌ها را بیشتر از طریق ممانعت از تشکیل آن‌ها مختل می‌کند (در واقع بیشتر از روش اول که در بالا ذکر شد) (۱۰). در نتیجه، تاکسان‌ها عامل تثبیت میکروتوبول‌ها در برابر Depolymerization و به وجود آمدن بسته‌های غیر طبیعی میکروتوبول‌ها می‌باشند (۸، ۱۱). این دسته‌های غیر طبیعی مانع جدا شدن طبیعی کروموزوم‌ها از هم می‌شوند. دسته‌های غیر طبیعی در سلول‌های توموری تجمع پیدا کرده، از تکثیر سلول ممانعت به عمل می‌آورند و چرخه‌ی سلول را در فاز بین  $G_2/M$  متوقف می‌نمایند (۱۲-۱۳). دوستاکسل یک داروی آنتاگونیست و نیمه‌ستتری از پکلی تاکسل است که از درخت نادر سرخدار اقیانوسی با نام *Taxus brevifolia* گرفته می‌شود (۱۴-۱۵). این دارو در سال ۱۹۹۶، به وسیله‌ی FDA (Food and Drug Administration)، برای درمان سرطان پستان تأیید شد (۱۵). تحقیقات گزارش کرده‌اند که دوستاکسل اثر حساس‌کنندگی پرتویی در سلول‌های کولون، ریه، سر و سلول‌های سرطانی ناحیه‌ی گردن در محیط برون‌تنی دارد (۲۰-۱۶). تأثیر داروی دوستاکسل همراه با تابش‌دهی هم‌زمان بر روی رده‌های مختلف سلولی از جمله سلول‌های کولون، ریه، سر و سلول‌های گردنی، در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است (۲۱).

مهم‌ترین نکته در مورد استفاده از داروی دوستاکسل در مطالعات آزمایشگاهی، مدت زمان در معرض قرارگیری سلول (Exposure time) با دارو می‌باشد. در مطالعات ذکر شده، جهت سنجش میزان حساس‌کنندگی پرتوی این دارو، عوامل مختلفی

برای پاساژ سلول‌ها، ابتدا محیط کشت قدیمی از فلاسک‌ها خارج گردید و سلول‌ها با استفاده از PBS (Phosphate buffered saline) (GIBCO company، آمریکا) شستشو داده شد. سپس، به فلاسک‌ها ۳ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین اضافه و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور نگهداری گردید تا آنزیم اثر کند و سلول‌ها از کف فلاسک جدا شود. پس از خارج کردن فلاسک از داخل انکوباتور و حصول اطمینان از جدا شدن سلول‌ها به منظور خنثی‌سازی فعالیت بیشتر آنزیم، به فلاسک حدود ۳ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و سوسپانسیونی از سلول‌ها آماده گردید. این سوسپانسیون سلولی به فالکون انتقال داده شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد تا رسوبی از سلول‌ها حاصل گردد. سپس محیط رویی رسوب سلولی تخلیه و محیط کشت جدید اضافه شد. تمام مراحل کشت سلولی در زیر هود انجام گرفت.

سلول‌ها به سه گروه شامل، گروه تزریق دارو و زمان در معرض قرارگیری ۵ ساعت (گروه اول)، گروه تزریق دارو و زمان در معرض قرارگیری ۲۴ ساعت (گروه دوم) و گروه شاهد تقسیم شدند. زمان‌های ۵ و ۲۴ ساعت به عنوان بالاترین و پایین‌ترین زمان، با توجه به مطالعات قبلی (۲۰-۱۶) صورت گرفته بر روی سلول‌های مختلف، انتخاب شد. هیچ گونه آزمایشی بر روی گروه شاهد انجام نشد. در گروه اول، ابتدا داروی دوستاکسل (Actavis pharmaceutical company) از بیمارستان سیدالشهدای اصفهان تهیه گردید. از طریق روش محلول‌سازی، محلول‌هایی از دارو در غلظت‌های ۱، ۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تهیه و به

همچون نوع سلول، میزان فعالیت سلول، غلظت دارو و زمان تست‌گیری به عنوان فاکتور متغیر و مدت زمان در معرض قرارگیری به صورت یک عامل تصادفی در نظر گرفته می‌شود. با توجه به احتمال اثرگذاری مدت زمان در معرض قرارگیری در افزایش حساس‌کنندگی پرتوی این دارو و افزایش میزان مرگ سلولی، بررسی این عامل به عنوان یک متغیر غیر تصادفی امری ضروری به نظر می‌رسید.

طبق بررسی‌های انجام شده، مطالعه‌ای مبنی بر در نظر گرفتن این فاکتور در هنگام استفاده از داروی دوستاکسل وجود نداشت و در بیشتر موارد، انتخاب این عامل با توجه به مطالعات گذشته بنا می‌شود که ممکن است عاملی حیاتی باشد و نتایج را دستخوش تغییراتی کند و از صحت و دقت آن بکاهد. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر مدت زمان در معرض قرارگیری داروی دوستاکسل و تعیین میزان اثر این عامل در میزان افزایش مرگ سلولی رده‌ی سلول‌های سرطانی پستان MCF-۷ به صورت برون‌تنی بود.

## روش‌ها

کشت سلول: سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-۷ از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Bioldia company، هندوستان) همراه با ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Bioldia company، هندوستان)، در فلاسک TV۵ کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه گردید.

توسط یک میکروتیتر پلیت ریدر (ELISA) یا Enzyme-linked immunosorbent assay) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. میزان سمیت و مرگ سلولی ایجاد شده با استفاده از فرمول زیر مورد محاسبه قرار گرفت:

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب خوانده شده برای هر نمونه}}{\text{میانگین جذب خوانده شده نمونه‌ی شاهد}} = \text{درصد}$$

زنده بودن سلول‌ها: تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و با محاسبه‌ی مقدار میانگین و انحراف معیار، میزان تغییرات به دست آمد. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل گردید و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

نتایج حاصل از MTT: نتایج حاصل از بررسی اثر داروی دوستاکسل با مدت در معرض قرارگیری ۵ ساعت، بر میزان زنده بودن سلول‌های MCF-7 در سه بازه‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در شکل‌های ۱-۳ ارزیابی شده است.

شکل ۱ نتایج حاصل از تست MTT پس از گذشت ۲۴ ساعت برای سه گروه (شاهد، اول و دوم) را نشان می‌دهد. بر این اساس، سمیت دارو در دوزهای بالا (بالتر از ۷۵ میکرومولار) در مقایسه با گروه شاهد به وجود آمد. اختلاف معنی‌داری در میزان مرگ سلولی در گروه‌های اول و دوم در تمام غلظت‌ها مشاهده نشد.

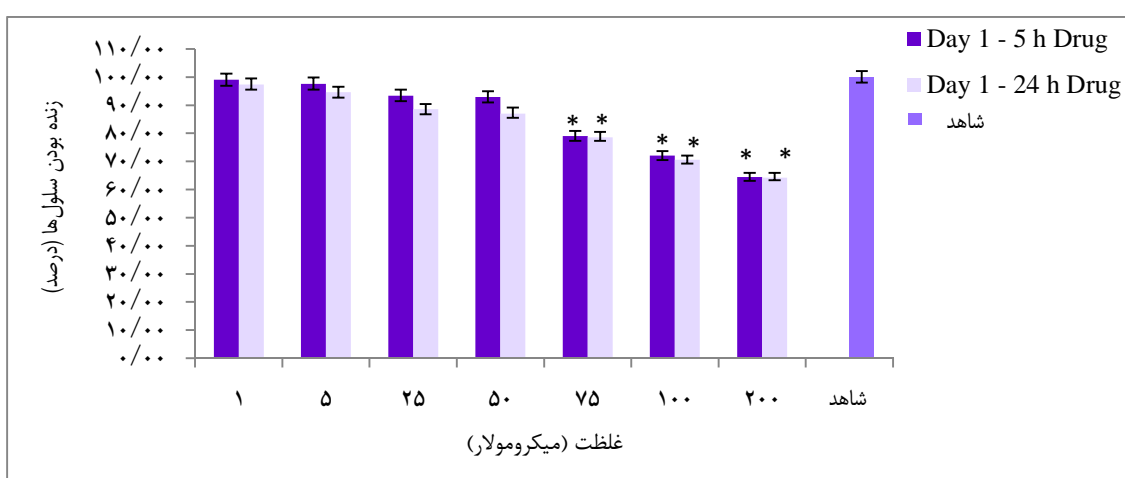
شکل ۲ نتایج حاصل از تست MTT پس از گذشت ۴۸ ساعت را در سه گروه شاهد، اول و دوم

چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای (شامل ۵۰۰۰ سلول) تزریق شد و سپس انکوبه گردید و بعد از ۵ ساعت از هر چاهک تخلیه شد. در گروه دوم، تزریق در غلظت‌های ۱، ۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از دارو انجام شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و از ظرف تخلیه گردید.

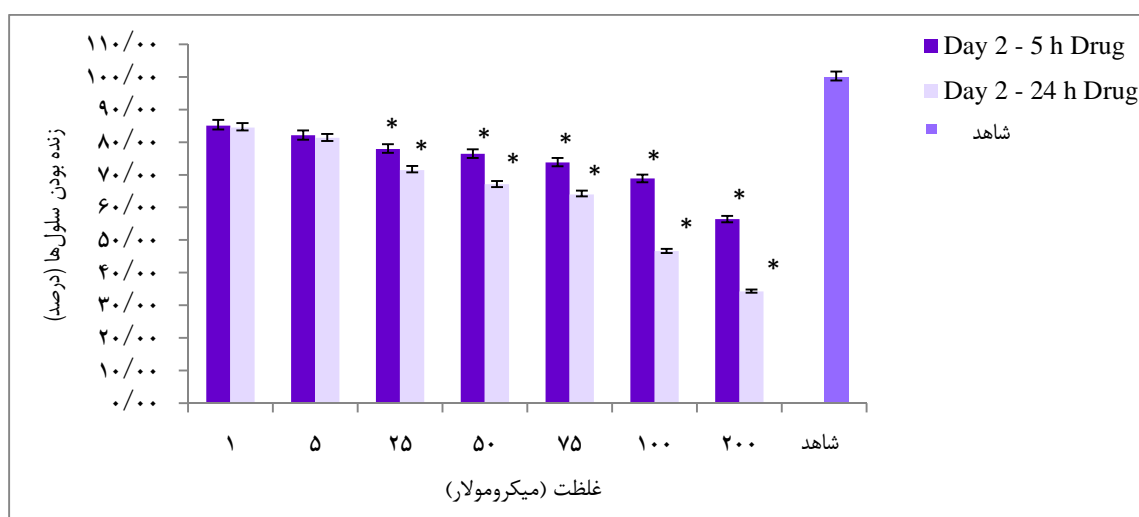
برآورد میزان تکثیر و بقای سلول‌ها: رنگ آمیزی MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]: این روش بر اساس احیای رنگ MTT استوار است که در آن محلول MTT پس از تزریق به ظرف حاوی سلول‌ها، توسط میتوکندری سلول‌های زنده جذب می‌شود. احیای مجدد آن، باعث ارغوانی رنگ شدن محلول حاوی سلول می‌گردد که با تعیین میزان غلظت این رنگ، می‌توان میزان سلول‌های زنده را تعیین نمود. جهت تهیه محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم، ۵۰ میلی‌گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی‌لیتر از PBS ۰/۱۵ مولار حل شد و هنگام استفاده در رنگ‌آمیزی، ۱۰ برابر با PBS رقیق گردید تا محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT به دست آید. لازم به ذکر است که پس از تهیه‌ی PBS، محلول اتوکلاو (Autoclave) شد. پس از انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار داروی دوستاکسل، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در پلیت‌های دارای دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه و با محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT رنگ‌آمیزی گردید. پس از ۴ ساعت، مایع رویی سلول‌ها برداشته شد و به جای آن، ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به حفره‌های مربوط اضافه گردید. سپس، پلیت مربوط

گروه‌های شاهد، اول و دوم در شکل ۳ ارزیابی شده است. افزایش معنی‌داری در مرگ سلولی در غلظت ۵ میکرومولار برای گروه‌های اول و دوم نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. بر این اساس، اختلاف معنی‌داری در میزان مرگ سلولی گروه‌های اول و دوم، به ویژه در غلظت‌های بالا وجود داشت. نکته‌ی مهم و قابل توجه در این شکل، افزایش میزان زنده بودن سلول‌ها در گروه اول نسبت به گروه شاهد و حتی گروه دوم بود.

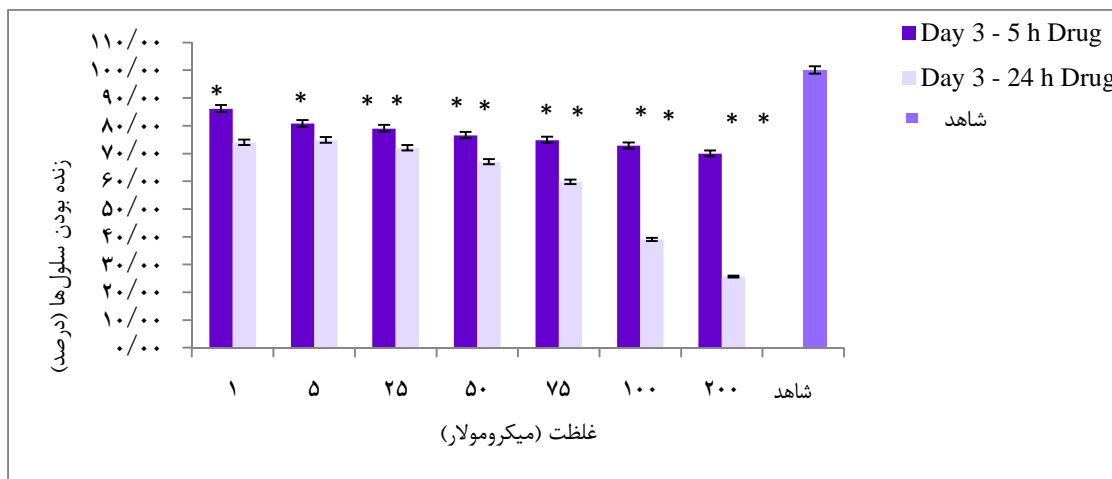
نشان می‌دهد. افزایش میزان مرگ سلولی در گروه‌های دارای دوز بیشتر از ۲۵ میکرومولار مشهود و معنی‌دار بود. مقایسه‌ی گروه‌های اول و دوم در غلظت‌های پایین، اختلاف معنی‌داری را در میزان مرگ سلولی نشان نداد، اما در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، اختلاف معنی‌داری در کاهش حیات سلولی بین گروه‌های اول و دوم مشاهده شد. نتایج تست MTT پس از گذشت ۷۲ ساعت در



شکل ۱. مقایسه‌ی اثر داروی دوستاکسل بر میزان زنده بودن سلول‌های MCF-۷ پس از ۲۴ ساعت برای گروه‌های اول و دوم  
 $P < 0.05^*$



شکل ۲. مقایسه‌ی اثر داروی دوستاکسل بر میزان زنده بودن سلول‌های MCF-۷ پس از ۴۸ ساعت برای گروه‌های اول و دوم  
 $P < 0.05^*$



شکل ۳. مقایسه‌ی اثر داروی دوستاکسل بر میزان زنده بودن سلول‌های MCF-7 پس از ۷۲ ساعت برای گروه‌های اول و دوم  
 $P < 0.05^*$

که در پژوهش حاضر به این موضوع پرداخته شد. با توجه به یافته‌های ما، میزان حیات سلولی ۲۴ ساعت بعد از خارج کردن دارو از پلیت در گروه‌های اول، دوم و شاهد، فقط در سه غلظت ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار معنی‌دار بود که نشان دهنده‌ی اثرگذاری پایین دارو برای ایجاد مرگ سلولی چه با زمان در معرض قرارگیری ۵ ساعت و چه زمان در معرض قرارگیری ۲۴ ساعت می‌باشد؛ اما برای تست‌گیری در زمان ۴۸ ساعت، اثربخشی قابل توجه دارو و افزایش میزان مرگ سلولی در گروه‌های اول و دوم، نشان دهنده‌ی زمان لازم برای رسیدن به سمیت سلولی است. تفاوت مرگ سلولی در گروه‌های اول و دوم (به خصوص گروه دوم) در غلظت بالا، شاید به دلیل جذب بیشتر و افزایش میزبان Depolymerization در سلول باشد. در گروه‌های اول و دوم، با افزایش غلظت دارو، میزان مرگ سلولی MCF-7 افزایش یافت که این امر نشان دهنده‌ی افزایش سمیت سلولی داروی فوق با افزایش میزان غلظت می‌باشد.

## بحث

در سال‌های اخیر، استفاده از داروهای شیمی‌درمانی همراه با رادیوتراپی، راه جدید و استراتژی مؤثری برای درمان سرطان به شمار می‌رود. مدارک و شواهد موجود نشان می‌دهد که استفاده از برخی داروهای شیمی‌درمانی در حین رادیوتراپی در درمان بعضی از سرطان‌ها، هم می‌تواند باعث کنترل رشد تومور و هم افزایش کیفیت درمان بیماران شود. این داروها با به وجود آوردن اثر هم‌افزایی، باعث می‌شوند که تأثیر رادیوتراپی در یک ناحیه بیشترین مقدار خود را داشته باشد و کمترین اثر تخریبی را در بافت‌های سالم ایجاد کند. در واقع، با متوقف کردن چرخه‌ی سلولی در فاز G<sub>2</sub>/M که دارای بیشترین حساسیت به تابش‌های یونیزان می‌باشد، باعث افزایش میزان آسیب به سلول می‌شود. یکی از این داروها، دوستاکسل است که به خانواده‌ی تاکسان‌ها تعلق دارد. از جمله شاخص‌هایی که در مطالعات برون‌تنی این دارو بر روی سلول مورد توجه قرار نمی‌گیرد، تأثیر میزان زمان در معرض قرارگیری سلول‌ها با دارو می‌باشد

گروه‌های شاهد و دوم افزایش یافت. این اتفاق دلیل بسیار روشنی برای اهمیت تفاوت‌های اعمال مدت زمان در معرض قرارگیری، در هنگام استفاده از داروی دوستاکسل می‌باشد.

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، در هنگام انجام مطالعات برون‌تنی جهت استفاده از داروی دوستاکسل، مدت زمان در معرض قرار گرفتن سلول‌ها عامل بسیار مهم و تأثیرگذاری در میزان حیات سلولی می‌باشد. استفاده از این شاخص، در هنگام استفاده از غلظت‌های بالای دارو و افزایش در هم‌فاز شدن سلول‌ها در فاز  $G_2/M$  و حساسیت بالای این مرحله به تابش‌های یونیزان، می‌تواند گام مطمئنی در رسیدن به نتایج صحیح و با دقت بالا، در تحقیقات محققان و دانشمندان در حیطه‌ی درمان‌های سرطان از طریق شیمی درمانی و رادیوتراپی باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد علی ابراهیمی فرد به شماره‌ی پژوهشی ۳۹۳۴۲۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. از کارکنان آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی و همچنین، خانم دکتر زارع‌پور و تمام کسانی که در انجام این مطالعه با ما همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نتایج پژوهش Balkman و همکاران (۲۲) با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت، اما به دلیل تفاوت در نوع سلول به کار گرفته شده و میزان در معرض قرارگیری دارو به مدت ۱ ساعت، میزان مرگ سلولی متفاوت بود.

Fabbri و همکاران در پژوهشی به بررسی اثر داروی دوستاکسل بر میکروتوبول‌ها پرداختند و مدت زمان در معرض قرار دادن سلول‌ها را ۵ ساعت در نظر گرفتند (۲۳) که در غلظت‌های پایین با نتایج مطالعه‌ی حاضر همخوانی داشت، اما در غلظت‌های بالا هیچ گزارشی منتشر نکردند.

Hernandez-Vargas و همکاران نیز تحقیق خود را بر روی سلول‌های  $MG-132$  انجام دادند و مدت زمان در معرض قرار دادن سلول‌ها را ۲۴ ساعت در نظر گرفتند. آنان گزارش نمودند که میزان مرگ سلولی با افزایش غلظت دارو، افزایش می‌یابد (۱۴) که مطابق نتایج مطالعه‌ی حاضر بود، اما به دلیل تفاوت در نوع سلول، نرخ مرگ سلولی تفاوت داشت.

در این مطالعه، افزایش دوباره‌ی میزان زنده ماندن سلول‌ها در گروه اول، نکته‌ی قابل تأملی است. انتظار می‌رفت که با افزایش زمان تست‌گیری به ۴۸ ساعت، میزان حیات سلولی نسبت به ۲۴ ساعت، دچار کاهش بیشتری گردد، اما نه تنها کاهش بیشتر در حیات سلولی مشاهده نشد، بلکه میزان آن نسبت به

### References

1. Akbari A, Razzaghi Z, Homae F, Khayamzadeh M, Movahedi M, Akbari ME. Parity and breastfeeding are preventive measures against breast cancer in Iranian women. *Breast Cancer* 2011; 18(1): 51-5.
2. Huo D, Adebamowo CA, Ogundiran TO, Akang EE, Campbell O, Adenipekun A, et al. Parity and breastfeeding are protective against breast cancer in Nigerian women. *Br J Cancer* 2008; 98(5): 992-6.
3. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, Moiseyenko V, Ayoub JP, Cervantes G, et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated

- patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 2002; 20(12): 2812-23.
4. Liu B, Staren ED, Iwamura T, Appert HE, Howard JM. Mechanisms of taxotere-related drug resistance in pancreatic carcinoma. *J Surg Res* 2001; 99(2): 179-86.
  5. Eniu A, Palmieri FM, Perez EA. Weekly administration of docetaxel and paclitaxel in metastatic or advanced breast cancer. *Oncologist* 2005; 10(9): 665-85.
  6. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 1998; 391(6663): 199-203.
  7. Clemons M, Leahy M, Valle J, Jayson G, Ranson M, Hayes S, et al. Review of recent trials of chemotherapy for advanced breast cancer: studies excluding taxanes. *Eur J Cancer* 1997; 33(13): 2171-82.
  8. Wilson L, Jordan MA. Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chem Biol* 1995; 2(9): 569-73.
  9. Qi C, Zhu YJ, Zhao XY, Lu BQ, Tang QL, Zhao J, et al. Highly stable amorphous calcium phosphate porous nanospheres: microwave-assisted rapid synthesis using ATP as phosphorus source and stabilizer, and their application in anticancer drug delivery. *Chemistry* 2013; 19(3): 981-7.
  10. Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell* 1999; 10(4): 947-59.
  11. Crown J. Docetaxel: overview of an active drug for breast cancer. *Oncologist* 2001; 6(Suppl 3): 1-4.
  12. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1785(2): 96-132.
  13. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J Biol Chem* 1981; 256(20): 10435-41.
  14. Hernandez-Vargas H, Palacios J, Moreno-Bueno G. Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene* 2007; 26(20): 2902-13.
  15. Clarke SJ, Rivory LP. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36(2): 99-114.
  16. Tishler RB, Norris CM, Jr., Colevas AD, Lamb CC, Karp D, Busse PM, et al. A Phase I/II trial of concurrent docetaxel and radiation after induction chemotherapy in patients with poor prognosis squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2002; 95(7): 1472-81.
  17. Calais G, Bardet E, Sire C, Alfonsi M, Bourhis J, Rhein B, et al. Radiotherapy with concomitant weekly docetaxel for Stages III/IV oropharynx carcinoma. Results of the 98-02 GORTEC Phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58(1): 161-6.
  18. Colevas AD, Busse PM, Norris CM, Fried M, Tishler RB, Poulin M, et al. Induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, fluorouracil, and leucovorin for squamous cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* 1998; 16(4): 1331-9.
  19. Kovacs AF, Mose S, Bottcher HD, Bitter K. Multimodality treatment including postoperative radiation and concurrent chemotherapy with weekly docetaxel is feasible and effective in patients with oral and oropharyngeal cancer. *Strahlenther Onkol* 2005; 181(1): 26-34.
  20. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007; 357(17): 1695-704.
  21. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The radiobiology of human cells and tissues. In vitro radiosensitivity. The picture has changed in the 1980s. *Int J Radiat Biol* 1989; 56(5): 525-37.
  22. Balkman CE, Gieger TL, Zgola MM, Lewis LD, McEntee MC. In vitro characterization of docetaxel as a radiosensitizer in canine and feline cancer cell lines. *Open J Vet Med* 2012; 2(4): 285-92.
  23. Fabbri F, Carloni S, Brigliadori G, Zoli W, Lapalombella R, Marini M. Sequential events of apoptosis involving docetaxel, a microtubule-interfering agent: a cytometric study. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 6.



## Investigation the Effect of the Exposure Time of Docetaxel on MCF-7 Cell Line: An In-Vitro Assessment

Ali Ebrahimifard<sup>1</sup>, Mohammad Bagher Tavakoli PhD<sup>2</sup>, Hosein Salehi PhD<sup>3</sup>,  
Hamid Imami MD<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Chemotherapy is one of the most applied methods in cancer treatment. Selection of the most effective cytostatic drug for cancer treatment is an important step in chemotherapy. Docetaxel is a drug that has especial effect when it combined with ionization radiation. The main effect of docetaxel is to block the cell cycle at the G<sub>2</sub>/M phase which has special sensitivity to the ionizing radiation. Different factors can impress the combination effect of their usage; one of them is exposure time of docetaxel with cells. In this study, we provided an experimental study about different exposure-time-induced effects of docetaxel on MCF-7 cells.

**Methods:** We divided cells in three groups of control and 1 and 2 which were treated with different concentration of docetaxel for 5 or 24 hour, respectively. In-vitro cell viability tests were done to investigate their effect on MCF-7 cell line for 24, 48 and 72 hours after the experiment.

**Findings:** The cytotoxicity was depended on the concentration of docetaxel. There was a significant decrease in cell viability at all concentration, especially in high concentrations for group 2 compared with group 1 which indicated time- and dose- dependency of the drug.

**Conclusion:** Our study demonstrated that exposure time has an important effect on viability of the cells were treated with docetaxel. This phenomenon can affect treatment of cancer, especially in the field of combination therapy.

**Keywords:** Breast cancer, Chemotherapy, Doctaxel, MCF-7

**Citation:** Ebrahimifard A, Tavakoli MB, Salehi H, Imami H. **Investigation the Effect of the Exposure Time of Docetaxel on MCF-7 Cell Line: An In-Vitro Assessment.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(345): 1272-80

1- MSc Student, Department of Medical Physics and Biomedical Engineering, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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

3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Radiation and Oncology, Seyed Al-Shohada Hospital, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Mohammad Bagher Tavakoli PhD, Email: mb.tava20001956@gmail.com

## بررسی فراوانی نسبی عوارض زودرس ایجاد شده پس از عمل کولهسیستکتومی لاپاروسکوپیک در بیمارستان آموزشی الزهراء (س) اصفهان (۹۰-۱۳۸۸)

دکتر بهروز کلیدری<sup>۱</sup>، حسن دهقان بنادکوکي<sup>۲</sup>، مهدی خزایی<sup>۳</sup>، دکتر شهاب شهابی شاهمیری<sup>۳</sup>

### مقاله کوتاه

#### چکیده

**مقدمه:** بیماری سنگ‌های صفراوی یکی از مشکلات شایع در جامعه می‌باشد و هم‌اکنون، کولهسیستکتومی لاپاروسکوپیک به عنوان روش استاندارد طلایی درمان آن شناخته می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی اعمال جراحی کولهسیستکتومی لاپاروسکوپیک انجام شده طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۸ در بیمارستان آموزشی الزهراء (س) اصفهان به منظور تعیین فراوانی عوارض بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه‌ی توصیفی-تحلیلی گذشته‌نگر، پرونده‌های بیماران واجد شرایط مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات دموگرافیک، عوارض زودرس و علت جراحی ثبت شد. به طور کلی، ۶۸۳ کولهسیستکتومی لاپاروسکوپیک در بازه‌ی زمانی مورد مطالعه انجام گرفته بود که از این تعداد، ۳۱۴ مورد با روش انتخاب تصادفی ساده، مورد مطالعه قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری  $\chi^2$  دقیق Fisher و t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از بین ۳۱۴ بیمار مورد بررسی، ۷۵ نفر (۲۳/۹ درصد) مرد و ۲۳۹ نفر (۷۶/۱ درصد) زن بودند. در این بین، ۲۴۸ مورد (۷۹/۰ درصد) با اندیکاسیون کولیک صفراوی، ۵۶ مورد (۱۷/۸ درصد) با کولهسیستیت حاد، ۹ مورد (۲/۹ درصد) با پانکراتیت صفراوی و ۱ مورد (۰/۳ درصد) با پولیپ کیسه‌ی صفرا تحت عمل جراحی قرار گرفتند. به طور کلی، عوارض مرتبط با کولهسیستکتومی لاپاروسکوپیک در ۱۲ مورد (۳/۸ درصد) گزارش شد. شایع‌ترین عارضه، نشت صفرا بود که در ۴ مورد (۱/۳ درصد) رخ داد؛ در رده‌ی بعدی، تنگی بعد از عمل جراحی قرار داشت که در ۳ مورد (۱/۰ درصد) ایجاد شد. عوارض دیگر شامل سنگ صفراوی به جا مانده ۲ مورد (۰/۶ درصد)، خون‌ریزی ۱ مورد (۰/۳ درصد)، آمبولی ریوی ۱ مورد (۰/۳ درصد) و پنوموتوراکس ۱ مورد (۰/۳ درصد) بود. تبدیل عمل به روش باز، در ۴ مورد (۱/۳ درصد) نیاز شده بود. هیچ موردی از مرگ و میر وجود نداشت.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که کولهسیستکتومی لاپاراسکوپیک به عنوان روش انتخابی و استاندارد درمان سنگ‌های کیسه‌ی صفرا، با میزان موفقیت بالایی همراه بوده و میزان بروز عوارض در آن، به نسبت پایین بوده است.

**واژگان کلیدی:** کولهسیستکتومی، لاپاروسکوپیک، عارضه

**ارجاع:** کلیدری بهروز، دهقان بنادکوکي حسن، خزایی مهدی، شهابی شاهمیری شهاب. بررسی فراوانی نسبی عوارض زودرس ایجاد شده

پس از عمل کولهسیستکتومی لاپاروسکوپیک در بیمارستان آموزشی الزهراء (س) اصفهان (۹۰-۱۳۸۸). مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۵): ۱۲۸۹-۱۲۸۱

۱- استادیار، گروه جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دستیار، گروه جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

## مقدمه

بیماری سنگ‌های صفراوی یکی از مشکلات شایع در جامعه می‌باشد و شیوع آن در بین کشورهای مختلف، متفاوت (۱۵-۱۰ درصد) است (۱-۲). هم‌اکنون، کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک به عنوان روش استاندارد طلایی درمان سنگ‌های صفراوی شناخته می‌شود. از جمله مزایای این روش نسبت به روش باز، می‌توان به کوتاه‌تر بودن مدت زمان عمل جراحی و طول مدت بستری، ریکاوری سریع‌تر بعد از عمل، کمتر بودن میزان عفونت زخم و مرگ و میر، بازگشت سریع‌تر به زندگی معمول و بهتر بودن پیامد عمل از لحاظ زیبایی اشاره کرد (۳-۴). کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک در برخی مراکز حتی به صورت سرپایی نیز انجام شده که نتایج خوبی به همراه داشته است (۵).

با وجود گسترش و مقبولیت جهانی، فواید بالینی و صرفه‌ی اقتصادی، روش کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک عوارضی را برای بیماران به همراه دارد. عوارض بعد از کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک در دو دسته‌ی مستقیم و غیرمستقیم طبقه‌بندی می‌گردد. دسته‌ی اول شامل عوارض مرتبط با کوله‌سیستکتومی یا لاپاروسکوپی می‌باشد که از این موارد می‌توان به عوارض صفراوی (افتادن سنگ به داخل حفره‌ی شکم، نشت صفرا، آسیب مجاری صفراوی، تنگی دیررس مجاری پس از عمل و سنگ به جا مانده)، خون‌ریزی، پانکراتیت و مرگ اشاره نمود. دسته‌ی دوم شامل عفونت زخم، ادم ریوی، پنومونی، پریکاردیت و ایلتوس می‌باشد (۶-۷). نتایج مطالعه‌ای که حاصل ادغام اطلاعات هفت بررسی بزرگ شامل ۸۸۵۶ مورد کوله‌سیستکتومی

لاپاروسکوپیک بود، نشان داد که در ۲/۶ درصد موارد عوارض جدی اتفاق می‌افتد (۸). در یک مقاله‌ی مروری حاصل هشت مطالعه‌ی گسترده، انواع و فراوانی عوارض اصلی کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک به صورت خون‌ریزی (۱/۹۷-۰/۱۱ درصد)، آبسه (۰/۳۰-۰/۱۴ درصد)، نشت صفرا (۰/۹۰-۰/۳۰ درصد)، آسیب مجاری صفراوی (۰/۶۰-۰/۲۶ درصد) و آسیب شکمی (۰/۳۵-۰/۱۴ درصد) گزارش شد (۹). تعدادی از بیمارانی که تحت عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک قرار می‌گیرند، به منظور تکمیل مطمئن عمل جراحی، به تغییر عمل به شیوه‌ی باز نیاز دارند. حدود ۲ تا ۱۵ درصد کوله‌سیستکتومی‌های لاپاروسکوپیک به روش باز تبدیل می‌شود که دلایل مختلفی دارد (۱۰).

در این مطالعه، اطلاعات حاصل از اعمال جراحی کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک انجام شده طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۸ در بیمارستان آموزشی الزهرای (س) اصفهان، به منظور تعیین فراوانی عوارض ایجاد شده، جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

## روش‌ها

مطالعه‌ی توصیفی-تحلیلی حاضر از نوع گذشته‌نگر بود و بر روی بیمارانی که در بازه‌ی زمانی ۱۳۸۸/۳/۳۱ تا ۱۳۹۰/۱۲/۲۷ در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان تحت عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک قرار گرفته بودند، انجام شد. به طور کلی ۶۸۳ کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک در این بازه‌ی زمانی انجام گرفته بود که از این تعداد، ۳۱۴ مورد با روش انتخاب تصادفی ساده بررسی گردید.

اندیکاسیون عمل جراحی مشاهده شد ( $P = 0/03$ )؛ به طوری که فراوانی کوله‌سیستیت حاد برای مردان و زنان به ترتیب برابر با  $28/0$  و  $14/6$  درصد بود. همچنین،  $70/7$  درصد مردان به دلیل کولیک صفراوی عمل جراحی شده بودند؛ در حالی که این میزان برای خانم‌ها،  $81/6$  درصد گزارش شد. میانگین سنی افرادی که به دلیل کولیک صفراوی تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، در گروه کوله‌سیستیت حاد  $47 \pm 15$  سال و در افرادی که با پانکراتیت صفراوی عمل جراحی شدند،  $55 \pm 18$  سال بود. اختلاف میانگین سنی بین گروه‌های فوق معنی‌دار بود ( $P = 0/04$ ).

به طور کلی عوارض مرتبط با کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک در ۱۲ مورد ( $3/8$  درصد) گزارش گردید. شایع‌ترین عارضه، نشت صفرا بود که در ۴ مورد ( $1/3$  درصد) رخ داد. در رده‌ی بعدی، تنگی بعد از عمل جراحی قرار داشت که در ۳ مورد ( $1/0$  درصد) ایجاد شد. عوارض دیگر به ترتیب شامل سنگ صفرا به جا مانده ۲ مورد ( $0/6$  درصد)، خون‌ریزی ۱ مورد ( $0/3$  درصد)، آمبولی ریوی ۱ مورد ( $0/3$  درصد) و پنوموتوراکس ۱ مورد ( $0/3$  درصد) بود. در مطالعه‌ی حاضر، تبدیل عمل به روش باز در ۴ مورد ( $1/3$  درصد) نیاز شده بود و موردی از عوارض احشایی، پنومونی، پریتونیت صفراوی و مرگ و میر گزارش نشد.

۴ نفر از مردان ( $5/3$  درصد) و ۸ نفر از زنان ( $3/3$  درصد) دچار عارضه شدند که از این نظر تفاوت معنی‌داری بین دو جنس وجود نداشت ( $P = 0/22$ ). میانگین سنی گروهی از بیماران که دچار عارضه شده بودند،  $50/6 \pm 12/7$  سال بود که

در هر مورد، پرونده‌ی بیماران و گزارش جراح با هدف جمع‌آوری اطلاعات دموگرافیک بیماران، علت جراحی، تبدیل عمل به روش باز، علت تبدیل عمل به روش باز، عوارضی که حین عمل ایجاد و توسط جراح گزارش گردیده و یا بعد از عمل اتفاق افتاده و در پرونده ذکر شده است و میزان مرگ و میر، مورد بررسی قرار گرفت. از پرونده‌های بررسی شده، مواردی که اطلاعات آن‌ها جهت انجام تحقیق ناقص بود، از مطالعه حذف و موارد دیگری جایگزین شد. اطلاعات به دست آمده، با استفاده از آزمون‌های دقیق Fisher،  $\chi^2$  و  $t$ ، در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل گردید و مورد استنتاج تحلیلی قرار گرفت.

### یافته‌ها

از بین ۳۱۴ بیماری که تحت عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک قرار گرفته بودند، ۷۵ نفر مرد ( $23/9$  درصد) و ۲۳۹ نفر زن ( $76/1$  درصد) بودند. جوان‌ترین بیمار، یک دختر ۱۷ ساله و مسن‌ترین بیمار، یک مرد ۹۸ ساله بود. میانگین سن زنان و مردان به ترتیب ۴۵ و ۴۷ سال و میانگین و انحراف معیار سنی کل بیماران مورد بررسی،  $45/5 \pm 15/0$  سال بود. در مجموع، بین دو جنس از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در میانگین سنی مشاهده نشد. در این بین، ۲۴۸ مورد ( $79/0$  درصد) با اندیکاسیون کولیک صفراوی، ۵۶ مورد ( $17/8$  درصد) با کوله‌سیستیت حاد، ۹ مورد ( $2/9$  درصد) با پانکراتیت صفراوی و یک مورد ( $0/3$  درصد) با پولیپ کیسه‌ی صفرا تحت عمل جراحی قرار گرفتند. اختلاف آماری معنی‌داری بین دو جنس در

گردید. این عوارض در مطالعات صورت گرفته در بیمارستان‌های امام خمینی (ره)، آریا و مهر اهواز (۱۴)، بیمارستان‌های آرتا و سیلان شهر اردبیل (۱۵)، بیمارستان‌های همدان (۱۶) و بیمارستان آیت‌اله گلپایگانی شهر قم (۱۷)، ۲/۶ تا ۶/۵ درصد به دست آمده است.

ضایعات مجاری صفراوی جدیدترین عارضه‌ی کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک است. آسیب مجاری صفراوی را می‌توان به دو دسته‌ی عمده (Major) و جزئی (Minor) تقسیم کرد. دسته‌ی عمده شامل انسداد و یا قطع مجرای کبدی مشترک یا مجرای صفراوی مشترک (Common bile duct یا CBD) یا مجاری سگمتال بزرگ آسیب دیده در ناف کبد است. موارد دیگری همچون نشت صفراوی از مجرای سیستیک (Cystic duct) یا بستر کیسه‌ی صفرا در دسته‌ی جزئی قرار می‌گیرند (۱۸). نشت صفرا شایع‌ترین عارضه‌ی کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک می‌باشد و میزان بروز آن ۰/۳-۰/۹ درصد بیان شده است (۹، ۱۹). شایع‌ترین عارضه‌ی ایجاد شده در مطالعه‌ی حاضر نیز، نشت صفرا (۱/۳ درصد) در بیماران بود که طی ۴-۸ روز بعد از عمل با علائم درد، تندرین شکم و تب مراجعه کرده بودند. تمام آنان سونوگرافی و آزمایش‌های کبدی طبیعی داشتند و با درمان طبی بهبود یافتند.

Triantafyllidis و همکاران، ۱۵ مورد نشت صفرا (۱/۴۹ درصد) را در بین ۱۰۰۹ مورد عمل جراحی کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک گزارش کردند که ۱۴ مورد در ۲۴ ساعت اول بعد از عمل و یک مورد در روز چهارم بعد از عمل تشخیص داده شد. میزان

تفاوت معنی‌داری را با گروه بدون عارضه (۱۵/۱ ± ۴۵/۲ سال) نشان نداد (P = ۰/۹۰).

فراوانی بروز عارضه بین افرادی که به دلیل کولیک صفراوی تحت عمل قرار گرفته بودند، ۷ مورد (۲/۸ درصد) و برای کوله‌سیستیت حاد، ۵ مورد (۸/۹ درصد) بود. اختلاف بروز عارضه، بین دو گروه معنی‌دار نبود (P = ۰/۱۳).

### بحث

عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک برای اولین بار توسط Philippe Mouret در سال ۱۹۸۷ در فرانسه معرفی شد و به سرعت انقلابی در درمان سنگ‌های صفراوی ایجاد کرد. امروزه این روش، درمان انتخابی برای سنگ‌های صفراوی علامت‌دار است (۱۱). با وجود مزیت‌های فراوان روش کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک، میزان بروز عوارض جدی آن مانند آسیب مجاری صفراوی در مقایسه با روش کوله‌سیستکتومی باز شایع‌تر می‌باشد (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر، زنان سه برابر مردان تحت این عمل جراحی قرار گرفته بودند و از آن‌جا که سنگ‌های صفراوی در زنان سه برابر شایع‌تر است، این یافته قابل انتظار می‌باشد (۱۳). همچنین، در مطالعات مختلف انجام گرفته در ایران، زنان به نسبت بیشتری (۷-۳ برابر) تحت عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک قرار گرفته‌اند (۱۴-۱۶). میانگین سنی بیماران تحت عمل جراحی، ۴۵/۵ سال بود که این میزان در دیگر مطالعات انجام شده در ایران، برابر با ۴۴/۶-۵۳/۰ سال می‌باشد (۱۷-۱۴).

عوارض مرتبط با کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک در تحقیق حاضر، در ۱۲ مورد (۳/۸ درصد) گزارش

نشت صفرا در ۴ مورد کم بود و با درمان طبی بهبود یافتند و در ۱۱ مورد میزان نشت صفرا قابل توجه بود. ۶ بیمار به دلیل علایم پریتونیت صفراوی، تحت عمل لاپاراتومی قرار گرفتند. ۵ بیمار هیچ گونه علایمی نداشتند و تحت ERCP (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography)، اسفنکترتومی و تعبیه‌ی استنت درون مجرا قرار گرفتند (۱۸).

میزان بروز آسیب عروقی عمده در لاپاروسکوپی ۰/۰۷ تا ۰/۴۰ درصد (شامل آنورت، عروق ایلپاک، ورید کاو، شریان‌های مزانتریک تحتانی و عروق کمری) و آسیب عروقی جزئی ۰/۱ تا ۱/۲ درصد (شامل شاخ‌های عروق اپی‌گاستر، عروق مزانتریک و امتال) گزارش شده است (۶، ۲۰). در بررسی حاضر نیز آسیب عروقی در یک مورد (۰/۳ درصد) بیان گردید که خون‌ریزی با لاپاراتومی و لیگیت کردن رگ آسیب دیده کنترل شد.

حدود ۱۰ درصد بیماران که تحت کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک قرار می‌گیرند، دارای سنگ مجرای صفراوی مشترک هستند. تا قبل از معرفی روش کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک، درمان این بیماران با جستجوی مجرای صفراوی مشترک حین کوله‌سیستکتومی باز صورت می‌گرفت. به تدریج، شیوه‌های لاپاروسکوپیک برای جستجوی مجرای صفراوی مشترک از جمله شیوه‌ی اکسپلوراسیون (شناسایی) از طریق مجرای سیستیک (Transcystic) و کلیدوکتومی (Transductal) گسترش یافت. یکی از راه‌های دفع سنگ در صورت وجود سنگ مجرای صفراوی مشترک کوچک یا اسلاژ، تزریق داخل وریدی گلوکاگون به منظور شل

شدن اسفنکتر می‌باشد (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر، ۵ جستجوی مجرای صفراوی مشترک و خارج کردن سنگ حین عمل وجود داشت که در یک مورد، سنگ CBD با تجویز گلوکاگون دفع گردید. با این وجود، در بعضی موارد سنگ مجرای صفراوی مشترک، حین عمل تشخیص داده نمی‌شود و موجب درد و بالا رفتن آنزیم‌های کبدی بعد از عمل می‌گردد. در مطالعه‌ی Turfah و همکاران، سنگ مجرای صفراوی مشترک به جا مانده در ۱/۱ درصد بیماران عمل شده، گزارش شد (۷). در تحقیق حاضر نیز سنگ مجرای صفراوی مشترک بعد از عمل در دو مورد (۰/۶ درصد) گزارش گردید که یک مورد دو هفته و مورد دیگر چهار ماه بعد از ترخیص، تشخیص داده شد. در هر دو مورد، ERCP و اسفنکترتومی انجام گرفت.

به تازگی، میزان بروز تنگی دیررس مجاری صفراوی خارج کبدی به طور قابل توجهی افزایش یافته است و شاید این امر به دلیل گستردگی استفاده از کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک باشد؛ چرا که، آسیب حرارتی خفیف موجب فیروز مجاری می‌گردد (۱۹). تنگی دیررس بعد از عمل اغلب در نتیجه‌ی بازسازی آسیب‌های بعد از کوله‌سیستکتومی یا استفاده‌ی بیش از حد الکتروکوتر (Electrocautery) در نزدیکی مجرای صفراوی مشترک، ایجاد می‌شود (۶). در پژوهش حاضر، تنگی دیررس بعد از عمل در ۳ مورد (۱ درصد) رخ داد. دو مورد طی دو ماه و یک مورد دو سال بعد از عمل با درد اپی‌گاستر مراجعه نمودند. در بررسی‌های پاراکلینیک، دیلاتاسیون مجرای صفراوی مشترک و افزایش آنزیم‌های کبدی گزارش شد. برای هر ۳ مورد ERCP و اسفنکترتومی انجام گرفت.

عنوان علل نیاز به تبدیل به روش باز گزارش شده است (۲۴). علل اصلی تبدیل به روش باز در پژوهش حاضر، آناتومی نامشخص و التهاب بیان گردید. همچنین، در ۴ مورد (۱/۳ درصد) به تبدیل عمل به روش باز نیاز شد که دو مورد آن (۰/۶ درصد) به دلیل التهاب و چسبندگی شدید، ۱ مورد (۰/۳ درصد) به علت خون‌ریزی غیرقابل کنترل و ۱ مورد (۰/۳ درصد) به علت زخم دئودنوم پاره شده بود. میزان مرگ و میر در کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک کمتر از ۱ درصد گزارش شده است (۲۵) که در مطالعه‌ی حاضر هیچ موردی از مرگ و میر وجود نداشت.

#### محدودیت‌ها

مطالعه‌ی حاضر بنا بر ماهیت گذشته‌نگر و بررسی مدارک پزشکی و پرونده‌ی بیماران، با محدودیت‌هایی همراه بود. برخی اطلاعات مانند مشخص نبودن اورژانسی یا غیر اورژانسی بودن اعمال جراحی در برخی پرونده‌ها ثبت نشده بود که یکی از محدودیت‌های مطالعه می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

در مجموع، تحقیق حاضر نشان می‌دهد که کوله‌سیستکتومی لاپاراسکوپیک به عنوان روش انتخابی و استاندارد درمان سنگ‌های کیسه‌ی صفرا با میزان موفقیت بسیار بالایی همراه است و داده‌های به دست آمده از این مطالعه با دیگر مطالعات ملی و بین‌المللی قابل قیاس می‌باشد.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری حرفه‌ای

بیمارانی که تحت عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک قرار می‌گیرند، در شرایط بیهوشی عمومی، وضعیت Trendelenburg معکوس با فشار پنوموپریوتون ۱۵-۱۲ میلی‌متر جیوه جراحی می‌شوند. تمام این عوامل می‌توانند باعث استاز وریدی در پاها و ترومبوز وریدهای عمقی بعد از عمل شوند (۲۲). نتایج یک مقاله‌ی مروری که بر روی ۱۵۳۸۳۲ مورد کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک انجام شده بود، حاکی از آن بود که میانگین ترومبوز وریدهای عمقی ۰/۰۳ درصد، میانگین آمبولی ریوی کشنده ۰/۰۲ درصد و میزان کل آمبولی ریوی ۰/۰۶ درصد می‌باشد (۲۳). در مطالعه‌ی حاضر در یک مورد (۰/۳ درصد)، بیمار حین بستری دچار تنگی نفس و تاکی‌کاردی شد و طی بررسی‌های انجام گرفته، تشخیص آمبولی ریوی برای وی تأیید گردید و تحت درمان آنتی‌کواگولان قرار گرفت. بیمار بعد از طی درمان و بهبود وضعیت عمومی، از بیمارستان ترخیص شد.

تعدادی از بیمارانی که تحت کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک قرار می‌گیرند، به منظور تکمیل مطمئن عمل، نیاز به تغییر روش به شیوه‌ی باز دارند. حدود ۱۵-۲ درصد کوله‌سیستکتومی‌های لاپاروسکوپیک، به دلایل مختلفی به روش باز تبدیل می‌شوند (۱۰). Bingener-Casey و همکاران، ۳۱۰ مورد (۵/۲ درصد) تبدیل به روش باز را در بین ۵۸۸۴ عمل کوله‌سیستکتومی لاپاروسکوپیک گزارش کردند. عواملی همچون عدم امکان شناسایی صحیح آناتومی (۵۰ درصد)، شک به آسیب مجاری صفراوی (۸ درصد)، خون‌ریزی (۱۴ درصد)، شک به سنگ کلدوک (۱۱ درصد) و علل دیگر (۱۶ درصد) به

مدارک پزشکی بیمارستان الزهرا (س) و همچنین، آقای دکتر راستین محمدی مفرد که در انجام پژوهش حاضر متحمل زحمات زیادی شدند، اعلام می‌دارند.

حسن دهقان بنادکوکي به شماره طرح ۳۹۱۱۶۱ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از کارکنان بخش

## References

- Portincasa P, Stolck MF, van Erpecum KJ, Palasciano G, van Berge-Henegouwen GP. Cholesterol gallstone formation in man and potential treatments of the gallbladder motility defect. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995; 212: 63-78.
- Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. *Lancet* 2006; 368(9531): 230-9.
- Tian Y, Wu SD, Su Y, Kong J, Yu H, Fan Y. Laparoscopic subtotal cholecystectomy as an alternative procedure designed to prevent bile duct injury: experience of a hospital in northern China. *Surg Today* 2009; 39(6): 510-3.
- Ercan M, Bostanci EB, Ulas M, Ozer I, Ozogul Y, Seven C, et al. Effects of previous abdominal surgery incision type on complications and conversion rate in laparoscopic cholecystectomy. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2009; 19(5): 373-8.
- Fassiadis N, Pepas L, Grandy-Smith S, Paix A, El-Hasani S. Outcome and patient acceptance of outpatient laparoscopic cholecystectomy. *JSLs* 2004; 8(3): 251-3.
- Shamiyeh A, Wayand W. Laparoscopic cholecystectomy: early and late complications and their treatment. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389(3): 164-71.
- Turfah F, Nazzal M, Ali MA, Lakra Y. Laparoscopic cholecystectomy: analysis of the complications at a community hospital. *Surg Laparosc Endosc* 1994; 4(4): 264-7.
- Strasberg SM, Hertl M, Soper NJ. An analysis of the problem of biliary injury during laparoscopic cholecystectomy. *J Am Coll Surg* 1995; 180(1): 101-25.
- Thurley PD, Dhingsa R. Laparoscopic cholecystectomy: postoperative imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 191(3): 794-801.
- Ibrahim S, Hean TK, Ho LS, Ravintharan T, Chye TN, Chee CH. Risk factors for conversion to open surgery in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *World J Surg* 2006; 30(9): 1698-704.
- Oddsottir M, Pham TH, Hunter JG. Gallbladder and the extrahepatic biliary system. In: Brunicaudi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, et al., editors. *Schwartz's principles of surgery*. 9<sup>th</sup> ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2010. p. 1136-64.
- Khan MH, Howard TJ, Fogel EL, Sherman S, McHenry L, Watkins JL, et al. Frequency of biliary complications after laparoscopic cholecystectomy detected by ERCP: experience at a large tertiary referral center. *Gastrointest Endosc* 2007; 65(2): 247-52.
- Nakeeb A, Comuzzie AG, Martin L, Sonnenberg GE, Swartz-Basile D, Kisebah AH, et al. Gallstones: genetics versus environment. *Ann Surg* 2002; 235(6): 842-9.
- Paziar F, Askarpour SH, Sharif R. Outcomes of the first group of laparoscopic cholecystectomy cases in Ahwaz. *Iran J Surg* 2005; 13(2): 77-83. [In Persian].
- Azimi H, Khademabbasi Sh. The results of laparoscopic cholecystectomy in Arta and Sabalan hospitals of Ardabil (2006-2009). *J Ardabil Univ Med Sci* 2011; 11(3): 238-45. [In Persian].
- Derakhshanfar A, Niayesh A, Ghasemi Farzad MM, Homae J. Assessment of the frequency of complications due to laparoscopic cholecystectomy at Hamedan hospitals (1997-2005). *Iran J Surg* 2008; 16(3): 57-63. [In Persian].
- Mousavi J, Razavian F. Consequences of laparoscopic cholecystectomy in Qom Golpaegani Hospital during 2005-2007. *Qom Univ Med Sci J* 2008; 2(1): 13-20. [In Persian].
- Triantafyllidis I, Nikoloudis N, Sapidis N, Chrissidou M, Kalaitidou I, Chrissidis T. Complications of laparoscopic cholecystectomy: our experience in a district general hospital. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2009; 19(6): 449-58.
- Kim JY, Kim KW, Ahn CS, Hwang S, Lee YJ, Shin YM, et al. Spectrum of biliary and nonbiliary complications after laparoscopic cholecystectomy: radiologic findings. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 191(3): 783-9.
- Deziel DJ, Millikan KW, Economou SG, Doolas A, Ko ST, Airan MC. Complications of laparoscopic cholecystectomy: a national survey



- of 4,292 hospitals and an analysis of 77,604 cases. *Am J Surg* 1993; 165(1): 9-14.
21. Petelin JB. Laparoscopic common bile duct exploration. *Surg Endosc* 2003; 17(11): 1705-15.
22. Caprini JA, Arcelus JJ, Laubach M, Size G, Hoffman KN, Coats RW, et al. Postoperative hypercoagulability and deep-vein thrombosis after laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 1995; 9(3): 304-9.
23. Lindberg F, Bergqvist D, Rasmussen I. Incidence of thromboembolic complications after laparoscopic cholecystectomy: review of the literature. *Surg Laparosc Endosc* 1997; 7(4): 324-31.
24. Bingener-Casey J, Richards ML, Strodel WE, Schwesinger WH, Sirinek KR. Reasons for conversion from laparoscopic to open cholecystectomy: a 10-year review. *J Gastrointest Surg* 2002; 6(6): 800-5.
25. Murphy MM, Shah SA, Simons JP, Csikesz NG, McDade TP, Bodnari A, et al. Predicting major complications after laparoscopic cholecystectomy: a simple risk score. *J Gastrointest Surg* 2009; 13(11): 1929-36.

## Frequency of Complications Following Laparoscopic Cholecystectomy in Alzahra Teaching Hospital, Isfahan, Iran (2009-2011)

Behrooz Kaleidari MD<sup>1</sup>, Hassan Dehghan-Banadkuki<sup>2</sup>, Mehdi Khazaei<sup>2</sup>,  
Shahab Shahabi-Shahmiri MD<sup>3</sup>

### Short Communication

#### Abstract

**Background:** Gallstone is one of the commonly encountered diseases in the general population. Laparoscopic cholecystectomy (LC) is now accepted as the “gold standard” for the treatment of gallstone. The purpose of this study was to present our data about the type and the incidence of complications of laparoscopic cholecystectomy.

**Methods:** A retrospective study was performed on the medical records of patients underwent laparoscopic cholecystectomy during the 2009 to 2011 in Alzahra Hospital, Isfahan, Iran. 683 laparoscopic cholecystectomies were performed during this period, of which, 314 cases were selected randomly and studied. The data were analyzed using chi-square, Fisher's exact and t tests.

**Findings:** Among 314 studied patients, 75 (23.9%) were men and 239 (76.1%) were women. 248 cases (79.0%) with indication of biliary colic, 56 (17.8%) with acute cholecystitis, 9 (2.9%) with biliary pancreatitis and 1 (0.3%) for gallbladder polyps were operated. The complications associated to laparoscopic cholecystectomy were reported in 12 cases (3.8%). The most common complication was bile leakage in 4 patients (1.3%) occurred by stenosis after the surgery in 3 cases (1.0%). Other complications were gallstones remaining in 2 cases (0.6%), bleeding in 1 case (0.3%), thromboembolism in 1 case (0.3%) and pneumothorax in 1 case (0.3%). Conversion to open surgery was required for 4 patients (1.3%) and no deaths were reported.

**Conclusion:** Our study suggests that laparoscopic cholecystectomy, as the procedure of choice for gallbladder stone treatment, has been associated with a high success rate and the incidence of complications was acceptably low.

**Keywords:** Cholecystectomy, Laparoscopy, Complication

**Citation:** Kaleidari B, Dehghan-Banadkuki H, Khazaei M, Shahabi-Shahmiri Sh. **Frequency of Complications Following Laparoscopic Cholecystectomy in Alzahra Teaching Hospital, Isfahan, Iran (2009-2011).** J Isfahan Med Sch 2015; 33(345): 1281-9

1- Assistant Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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

3- Resident, Department of Surgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Hassan Dehghan-Banadkuki, Email: dehghan\_287@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:

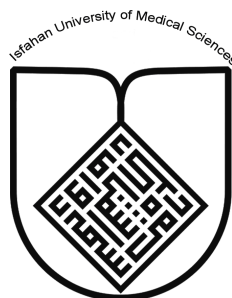
- a. **Article:** Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res.* 2002;935(1-2):40-6.
  - b. **Chapter in a book:** Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations 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. **Saeid Morteza Heidari** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
26. **Mansour karamooz** MD, Professor of Urology, California, USA
27. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
28. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics & Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
29. **Majid Khazaei** MD, PhD, Associate Professor of Medical Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
30. **Parvin Mahzooni** MD, Associate Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
31. **Majid Maleki** MD, Professor of Cardiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
32. **Mohammad Mardani** MD, Associate Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
33. **Atiye Moghisi** MD, Professor of Endocrinology, Endocrine and Metabolism Research Center, USA
34. **Mehdi Modares** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
35. **Hoshang Moein** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
36. **Fereydoun Nouhi** MD, Professor of Cardiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
37. **Mohammadreza Nourbakhsh** Associate Professor of Physiotherapy, USA
38. **Farzin Pourfarzad** Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands
39. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
40. **Hassan Razmju** MD, Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
41. **Mohammad Reza Safavi** MD, Assistant Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
42. **Reza Rouzbahani** MD, MPH, Assistant Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
43. **Mansour Sholevar** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
44. **Masoud Soheilian** MD, Professor of Ophthalmology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran



## JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 33, No. 345, 1<sup>st</sup> Week, October 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 indexers

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

---

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

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