

مقاله های پژوهشی

- ۲۱۰۵ شناسایی گونه های کاندیدا در دهان افراد مصرف کننده و غیر مصرف کننده سیگار محمد رضا جواهری، دکتر فائزه محمدی، دکتر مصطفی جادگانی پور، شهرام نکوئیان، دکتر پروین دهقان
- ۲۱۱۱ اثرات درمانی افزودن ویتامین D به اینترفرون بتا 1a در بیماران مبتلا به Multiple Sclerosis دکتر مسعود اعتمادی فر، زهرا توسلی کفرانی
- ۲۱۲۰ استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 برای تشخیص ناپایداری میکروستلایت در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC) نجمه فراهانی، دکتر پروانه نیک پور، دکتر محمد حسن امامی، دکتر مرتضی هاشم زاده، مهرداد زینلیان، دکتر رسول صالحی
- ۲۱۳۱ بررسی تأثیر بیپوشی عمومی بر زمان پر شدگی مویرگی در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب و مقایسه آن با گروه شاهد دکتر محمد گل پرور، دکتر سعید عباسی، رویا کثیری
- ۲۱۳۷ بررسی اثر میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روی ردهی سلول سرطانی MCF-7 دکتر داریوش شهبازی، محمد حسین عسگریان، دکتر سعید ستایشی، سلمان جعفری
- ۲۱۴۳ بیان و تخلیص ناحیه ی کینازی پروتئین نو تو کینب گیرنده ی عامل رشد فیبروبلاستی نوع 2b و بررسی تغییرات ساختاری آن بر اثر پرهم کنش آن با گالیک اسید فائزه سید عطاران، دکتر داریوش ایلغاری، دکتر نعمت اله غیبی، دکتر مهدی سهمانی، دکتر حسین پیری
- ۲۱۵۲ برنامه ی قلب سالم اصفهان: حجم نمونه و ساختارهای نمونه گیری فاطمه نوری، دکتر آوات فیضی، نوشین محمدی فر، دکتر نضال صراف زادگان

Original Articles

- Identification of Candida Species in Oral Cavity of Smokers and Nonsmokers 2110
 Mohammad Reza Javaheri, Faezeh Mohammadi PhD, Mostafa Chadeganipour PhD, Shahram Nekoian, Parvin Dehghan PhD
- Efficacy of Adding Vitamin D Supplementation to Interferon β -1 in Multiple Sclerosis 2119
 Masoud Etemadifar MD, Zahra Tavassoli-Kafrani
- MT1XT20 Single Quasi-Monomorphic Mononucleotide Marker for Detection of Microsatellite Instability in Iranian Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) 2130
 Najmeh Farahani, Parvaneh Nikpour PhD, Mohammad Hassan Emami MD, Morteza Hashemzadeh PhD, Mehrdad Zeinalian MSc, Rasoul Salehi PhD
- The Effect of General Anesthesia on Capillary Refill Time in Patients with Congestive Heart Failure Compared to the Control Group 2136
 Mohammad Golparvar MD, Saeid Abbasi MD, Roya Kasiri
- The Influence of Low-Frequency Electromagnetic Fields (ELFs) on MCF-7 Cancer Cells 2142
 Daryoush Shahbazi-Gahreuei PhD, Mohammadhossien Asgarian, Saeed Setayeshi PhD, Salman Jafari MSc
- Expression and Purification of the Recombinant Kinase Domain of FGFR2b and Study of its Structural Changes Due to the Interaction with Gallic Acid 2151
 Faezeh Seyyed-Attaran, Dariush Ilghari PhD, Nematollah Gheibi PhD, Mehdi Sahmani PhD, Hossein Piri PhD
- Isfahan Healthy Heart Program, Sample Size and Sampling Structure: A Comprehensive Report 2166
 Fatemeh Nouri MSc, Awat Feizi PhD, Noushin Mohammadifard MSc, Nizal Sarrafzadegan MD



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۶۲)، هفتم دوم بهمن ۱۳۹۴

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر مریم راد احمدی

ناشر:

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

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

E-mail: publications@mui.ac.ir

دفتر مجله: دانشکده پزشکی صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶

مسئول دفتر: گلناز رجبی

دورنگار: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۲۹۱

تلفن: ۰۳۱-۳۶۶۹۴۷۳۷

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

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

وب سایت مجله:

امور نشر:

(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)

شرکت فرزاتگان راداندیش

اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵

تلفن و دورنگار: ۰۳۱-۳۶۶۸۶۳۰۲

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

تیراژ: ۵۰۰ نسخه

این مجله در نمایه‌های بین‌المللی زیر در دسترس قرار دارد.

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

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

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

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

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

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

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

نحوه ارسال دست نوشته‌ها در سامانه

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

توجه به نکات زیر در ارسال مقاله ضروری است:

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

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

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

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

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

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

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

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

نحوه ارایه مقاله

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

- ارسال مقاله فقط از طریق سایت پذیرفته می‌شود.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

تبصره ۱- مقالات ترجمه پذیرفته نمی‌شود.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- روش‌ها: این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط منبع آن ذکر گردد اما اگر روشی نوین است، باید به صورتی توضیح داده شود که برای سایر محققان قابل درک و به طور عینی قابل انجام و تکرار باشد. در صورت استفاده از

دستگاه و تجهیزات خاص باید نام، نام کارخانه سازنده و آدرس آن در پراکنش ذکر گردد. اگر از دارو در مطالعه استفاده شده است باید نام ژنریک، دوز و روش مصرف آن آورده شود. در مورد افراد و بیماران تحت مطالعه باید جنس و سن (همراه انحراف معیار) آورده شود. در مورد نرم افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پراکنش و پس از نام آن ذکر گردد.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

نمونه انگلیسی:

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

نمونه فارسی:

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

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

- اگر منبع مورد نظر کتاب است:

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

نمونه انگلیسی:

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

نمونه فارسی:

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

- اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

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

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

- منابع به صورت پایان نامه

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

- منابع به صورت الکترونیکی - مجله الکترونیکی روی اینترنت

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

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

منابع به صورت صفحه وب

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

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

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

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

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

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

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

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

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

- ۲۱۰۵.....شناسایی گونه‌های کاندیدا در دهان افراد مصرف کننده و غیر مصرف کننده سیگار.....
محمدرضا جواهری، دکتر فائزه محمدی، دکتر مصطفی چادگانی پور، شهرام نکوئیان، دکتر پروین دهقان
- ۲۱۱۱.....اثرات درمانی افزودن ویتامین D به ایتر فرون بتا ۱a در بیماران مبتلا به Multiple Sclerosis.....
دکتر مسعود اعتمادی فر، زهرا توسلی کفرانی
- ۲۱۲۰.....استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 برای تشخیص ناپایداری میکروستلایت در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC).....
نجمه فراهانی، دکتر پروانه نیک پور، دکتر محمدحسن امامی، دکتر مرتضی هاشم‌زاده، مهرداد زینلیان، دکتر رسول صالحی
- ۲۱۳۱.....بررسی تأثیر بیهوشی عمومی بر زمان پر شدگی مویرگی در بیماران مبتلا به نارسای احتقانی قلب و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد.....
دکتر محمد گل‌پرور، دکتر سعید عباسی، رویا کنیری
- ۲۱۳۷.....بررسی اثر میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF-7.....
دکتر داریوش شهبازی، محمدحسین عسگریان، دکتر سعید ستایشی، سلمان جعفری
- ۲۱۴۳.....بیان و تخلیص ناحیه‌ی کینازی پروتئین نو ترکیب گیرنده‌ی عامل رشد فیروپلاستی نوع 2b و بررسی تغییرات ساختاری آن بر اثر برهم‌کنش آن با گالیک اسید.....
فائزه سید عطاران، دکتر داریوش ایلغاری، دکتر نعمت‌اله غیبی، دکتر مهدی سهمانی، دکتر حسین پیری
- ۲۱۵۲.....برنامه‌ی قلب سالم اصفهان: حجم نمونه و ساختارهای نمونه‌گیری.....
فاطمه نوری، دکتر آوات فیضی، نوشین محمدی فر، دکتر نضال صراف‌زادگان

شناسایی گونه‌های کاندیدا در دهان افراد مصرف کننده و غیر مصرف کننده سیگار

محمدرضا جواهری^۱، دکتر فائزه محمدی^۲، دکتر مصطفی چادگان پور^۳، شهرام نکوئیان^۴، دکتر پروین دهقان^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: *Candida albicans*، بیشترین گونه‌ی جدا شده از حفره‌ی دهان می‌باشد. ایجاد *Candidiasis* دهانی در نتیجه‌ی تشکیل بیوفیلم و رشد بیش از حد گونه‌های *Candida* است و مصرف سیگار، می‌تواند در کلونیزاسیون *Candida* در حفره‌ی دهان مؤثر باشد. هدف از این مطالعه، بررسی حضور و شناسایی گونه‌های *Candida* جدا شده از دهان مصرف کنندگان و غیر مصرف کنندگان سیگار بود.

روش‌ها: نمونه‌ها با استفاده از سوآب از حفره‌ی دهان و بزاق دو گروه ۳۸ نفره از مصرف کنندگان سیگار (گروه مورد) با میانگین سنی $48/50 \pm 9/75$ سال و غیرمصرف کنندگان آن (گروه شاهد) با میانگین سنی $44/68 \pm 10/79$ سال، جمع‌آوری گردید. سوآب‌ها بر روی محیط Sabouraud dextrose agar کشت داده شد و کلتی خالص به دست آمده، به محیط CHROMagar candida انتقال داده شد. همچنین، میزان قند بزاق و pH دهان هر دو گروه، مشخص گردید. شناسایی گونه‌های *Candida* با استفاده از Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) تکمیل شد.

یافته‌ها: فراوانی گونه‌های *Candida albicans*، *Candida kefir* و *Candida krusei* در گروه مورد به ترتیب ۴۲/۱۰، ۵/۳۰ و ۲/۶۳ درصد بود و در گروه شاهد، گونه‌های *Candida albicans* و *Candida kefir* به ترتیب به میزان ۲۶/۳۱ و ۲/۶۳ درصد مشاهده گردید. لازم به ذکر است که گونه‌های *Candida glabrata* و *Candida dubliniensis* در نمونه‌های هیچ یک از دو گروه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که شدت کلونیزاسیون *Candida albicans* در گروه مورد، بیش از افراد گروه شاهد بود. میزان قند بزاق، تعداد نخ مصرفی سیگار و عدم رعایت بهداشت دهان، مهم‌ترین عوامل مستعد کننده برای ایجاد کلونیزاسیون کاندیدا در دهان بود.

واژگان کلیدی: گونه‌های *Candida*، *Candidiasis* دهانی، Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism

ارجاع: جواهری محمد رضا، محمدی فائزه، چادگان پور مصطفی، نکوئیان شهرام، دهقان پروین. شناسایی گونه‌های کاندیدا در دهان افراد مصرف کننده‌ی

سیگار و غیر مصرف کننده‌ی سیگار. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۲): ۲۱۰۵-۲۱۰۵

Candida albicans با ترشح آنزیم کلاژنولیتیک، از محتویات کلاژن عاج دندان به عنوان منبع نیتروژنی استفاده می‌نماید و با کاهش در تولید کلاژن، باعث تخریب بافت دهانی می‌گردد (۱-۳). برخی تغییرات در محیط دهان مانند کاهش جریان بزاق، کاهش pH، سوزش و خشکی، افزایش میزان گلوکز، تجمع پلاک دهانی و تخریب بافت‌های پرئودنتال، باعث تغییر در فلور دهان می‌گردد و رشد بیشتر گونه‌های *Candida* را فراهم می‌آورد. این تغییرات، با کاهش یا تغییر نسبی در فلور میکروبی دهان، سبب کاهش مقاومت

مقدمه

Candidiasis، عفونتی است که توسط گونه‌های مختلف *Candida* به ویژه *Candida albicans* ایجاد می‌شود. در طی دو دهه‌ی اخیر، شیوع این عفونت‌ها به دلیل عوامل مستعد کننده رو به افزایش می‌باشد. *Candida albicans*، بیشترین فلور قارچی دهان را تشکیل می‌دهد. مواد معدنی عاج دندان اغلب از نمک‌های کلسیم به صورت بلورهای هیدروکسی آپاتیت می‌باشد که قدرت چسبندگی و حل کنندگی *Candida albicans* در مجاورت این بلورها زیاد است.

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

۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت و مؤسسه تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- استاد، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس ارشد، بخش سلولی مولکولی، مرکز بهداشت استان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- استادیار، گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

یافتی دهان می‌شود (۴-۵).

استفاده از تباکو، یک عامل محرک موضعی در ایجاد Candidiasis می‌باشد؛ چرا که باعث تغییر موضعی اپی تلیوم دهان می‌شود و این تغییر، باعث تسهیل در کلونیزه شدن گونه‌های Candida می‌گردد. همچنین، دود سیگار حاوی عوامل تغذیه‌ای برای Candida است؛ در نتیجه موجب فراهم آوردن یک محیط تغذیه‌ای مناسب برای Candida albicans می‌گردد (۶). مطالعات نشان می‌دهند که مصرف سیگار باعث کاهش pH دهان می‌شود و این در کلونیزاسیون گونه‌های Candida دخالت دارد (۷).

این موضوع که «آیا دود سیگار سبب افزایش کلونیزاسیون Candida می‌باشد؟»، در بسیاری از مطالعات مورد بحث است (۸-۹). در گزارش‌های متعددی، تأثیر دود سیگار به طور مجزا و یا همراه با عوامل زمینه‌ای موضعی و سیستمیک در میزان مورد مطالعه قرار گرفته است (۹، ۵). با توجه به کلونیزاسیون گونه‌های Candida در دهان افراد مصرف‌کننده سیگار و نیز استعمال زیاد سیگار در کشورمان، مطالعه‌ی حاضر با هدف شناسایی گونه‌های Candida در بزاق افراد مصرف‌کننده و غیرمصرف‌کننده سیگار انجام شد.

روش‌ها

نمونه‌گیری: از مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه بیمارستان سنندج در دو گروه ۳۸ نفره از مردان مصرف‌کننده سیگار (گروه مورد) یا میانگین سنی $48/5 \pm 9/75$ سال و غیر مصرف‌کننده سیگار (گروه شاهد) یا میانگین سنی $44/68 \pm 10/79$ سال، پس از تکمیل پرسش‌نامه و اخذ رضایت‌نامه، بدون شستن دهان، نمونه‌گیری به عمل آمد. مقرر شد افراد گروه مورد، حداقل ۲ ساعت قبل از نمونه‌گیری، سیگار استعمال نکرده باشند؛ هر دو گروه دارای قند خون طبیعی، فاقد دندان مصنوعی، عدم اعتیاد و فاقد هر گونه ضایعات، زخم و آفت دهانی باشند.

جهت اندازه‌گیری pH دهان، با استفاده از دستگاه سنجش pH و قند بزاق با استفاده از دستگاه Autoanalyzer، بزاق دهان در هر دو گروه، به صورت غیر تحریکی جمع‌آوری شد. بدین صورت که به بیمار اجازه داده شد که بزاق خود را در دهان نگه دارد و هر چند ثانیه یک بار در درون دو ظرف استریل درب دار، خارج نماید. نمونه‌گیری در صبح بین ساعات ۸-۱۰ در شرایط ناشتا انجام شد؛ چرا که حجم بزاق

در ساعات مختلف شبانه‌روز می‌تواند متفاوت باشد و همچنین اثر افزایش حجم بزاق ناشی از غذا خوردن خشی شده باشد.

کشت بر روی محیط‌های CHROMagar candida و

Sabouraud dextrose agar: نمونه‌گیری از حفره‌ی دهانی تمامی افراد مورد مطالعه با سواب استریل مرطوب، انجام شد و به محیط کشت Sabouraud dextrose agar منتقل و به مدت یک هفته در دمای ۲۵-۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، تمام پلیت‌ها از نظر رشد یا عدم رشد بررسی شد. تعداد کلنی رشد یافته، شمارش و از یک کلنی خالص، بر روی محیط کشت CHROMagar Candida کشت داده شد و تمام پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، انکوبه گردید. رشد Candida بر اساس رنگ کلنی ایجاد شده ارزیابی گردید (۱۰-۱۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction) یا PCR: استخراج DNA با استفاده از روش Glass bead فنل کلروفرم انجام گرفت (۱۳-۱۵). بر اساس مطالعات قبلی، از پرایمرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') که تنوع کافی جهت افتراق گونه‌های Candida دارند، استفاده گردید (۱۶). برای واکنش PCR، پس از آزمایش‌های متعدد، سرانجام یک واکنش ۵۰ میکرولیتری با ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر Deoxynucleotide nucleotide triphosphates (dNTP) ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر پرایمر رفت (ITS1) و برگشت (ITS4) $0/5$ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymeras $5 \text{ unit}/\mu\text{l}$ ، ۵ میکرولیتر DNA الگو و آب مقطر دیونیزه، انجام شد. پروفیل دمای مراحل تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. جهت بررسی باندهای مورد نظر از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

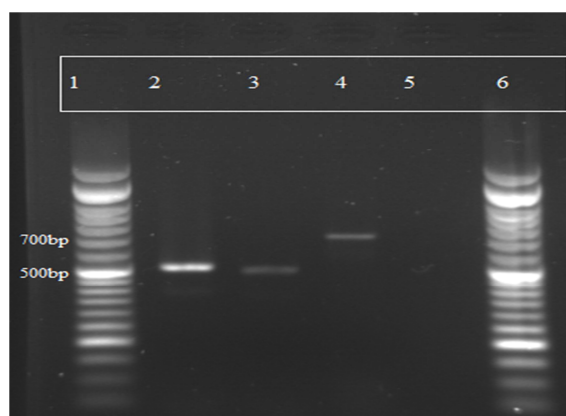
هضم محصولات PCR با آنزیم‌های اندونوکلاز (RFLP) یا Restriction fragment length polymorphism): برای ایجاد برش آنزیماتیک در رشته‌های تکثیر یافته‌ی DNA و تولید الگوهای متفاوت در مخمرهای مختلف، از دو آنزیم محدودالتر MspI و HinfI (سیناژن) استفاده گردید. آنزیم HinfI قادر است که Candida albicans را از Candida dubliniensis که با آنزیم MspI قابل افتراق نمی‌باشند، تفکیک نماید (۱۷).

جدول ۱. مراحل تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در این مطالعه

مرحله	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
Denaturation Initial	۹۵	۵ دقیقه	۱
Denaturation	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
Annealing	۵۶	۶۰ ثانیه	
Extention	۷۲	۶۰ ثانیه	
Final extention	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ۲. اندازه‌ی قطعات محصول PCR (Polymerase chain reaction) و RFLP (Restriction fragment length polymorphism) با آنزیم Hinf I (۱۶)

اندازه‌های باند برش خورده (bp) با آنزیم Hinf I	اندازه‌های باند برش خورده (bp) با آنزیم Hinf I	گونه‌های Candida
۲۷۰ و ۲۷۰	۲۴۰ و ۳۰۰	Candida albicans
۲۶۰ و ۲۶۰	۱۸۰ و ۳۴۰	Candida tropicalis
۲۹۰ و ۲۶۰	۲۴۰ و ۳۰۰	Candida dubliniensis
۲۴۰ (۱۵۰ و ۱۵۰)	۲۵۰ و ۲۶۰	Candida krusei
۳۶۰ (۲۷۰ و ۲۷۰)	۵۷۰ و ۳۳۰	Candida glabrata
۱۱۷ و ۱۳۱، ۲۳۶	۷۲۰	Candida kefir



شکل ۱. تکثیر نواحی ITS (Internal transcribed spacer) ریبوزومال با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 (چاک‌های ۱ و ۶: نشانگر مولکولی ۵۰ bp، چاک ۲: *Candida albicans*، چاک ۳: *Candida krusei*، چاک ۴: *Candida kefir*، چاک ۵: شاهد منفی)

بحث

حدود ۴۰۰ گونه از ارگانیزم‌های مختلف، ساکن حفره‌ی دهان می‌باشند؛ به طوری که در هر میلی‌لیتر از بزاق دهان، بیش از ۱۰۶ میکروارگانیزم می‌توان یافت. یکی از این میکروارگانیزم‌ها *Candida albicans* می‌باشد که بیشترین گونه‌ی *Candida* در دهان است و انواع دیگری که کمتر شایع هستند، شامل انواع *Candida tropicalis*، *Candida glabrata*، *Candida krusei*، *Candida parapsilosis* و *Candida guilliermondii* می‌شود (۱۸).

Candidiasis دهانی در نتیجه‌ی تشکیل بیوفیلم و رشد بیش از حد گونه‌های *Candida* ایجاد می‌شود. هر گونه تغییر در محیط دهان مثل افزایش گلوکز بزاق، کاهش pH بزاق، کاهش جریان بزاق، مصرف سیگار، سوزش و خشکی دهان باعث تسهیل در کلونیزاسیون گونه‌های *Candida* می‌شوند. ممکن است که سیگار به طور غیرمستقیم باعث افزایش هموگلوبین گلیکوزیله شود (۱۹).

طبق دستورالعمل، ۱۷ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر از هر کدام از آنزیم‌های مربوط، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۱ میکرولیتر از هر آنزیم مخلوط شد و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، نگه‌داری شد. جهت بررسی طول قطعات مورد نظر، از ژل ۲ درصد استفاده گردید (جدول ۲).

یافته‌ها

مطالعه‌ی حاضر بر روی دو گروه ۳۸ نفره از مردان مصرف‌کننده (گروه مورد) و غیر مصرف‌کننده‌ی سیگار (گروه شاهد)، پس از مراجعه به آزمایشگاه بیمارستان سنج، انجام گرفت.

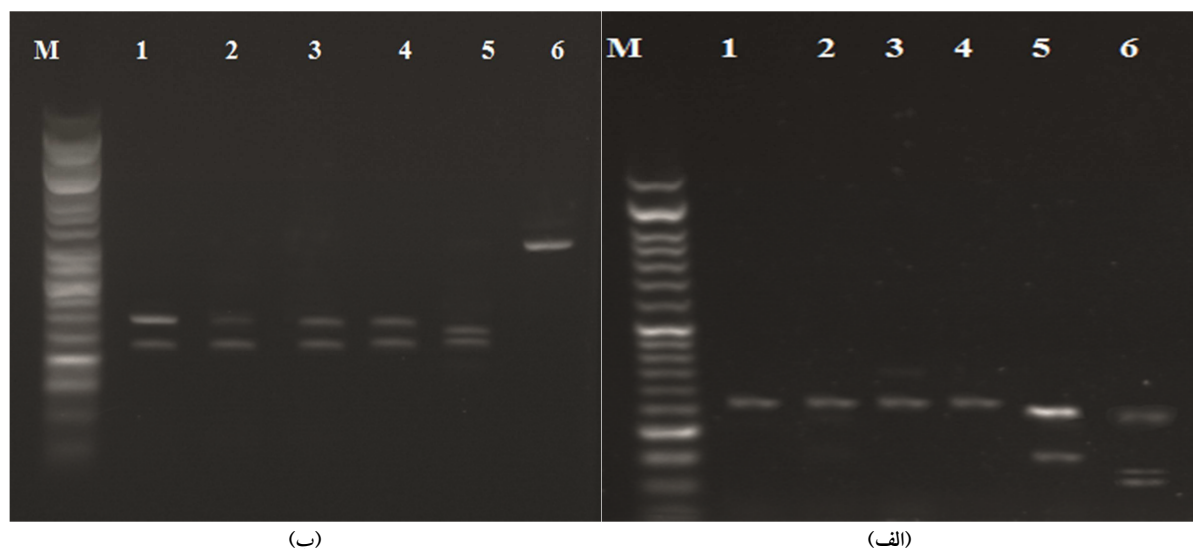
میزان کلونیزاسیون *Candida albicans* در دهان افراد گروه مورد بیش از افراد گروه شاهد بود؛ به طوری که میانگین سیگار مصرفی در افراد گروه مورد، $20/63 \pm 8/41$ نخ در روز و بر روی تعداد کلنی مخمر مؤثر بود ($P < 0/05$).

همچنین، میانگین میزان pH ارتباط معنی‌داری با تعداد کلنی جدا شده از دهان در دو گروه مورد مطالعه نشان نداد. میزان قند بزاق دهان نیز در گروه مورد $0/49 \pm 2/28$ و در گروه شاهد $25/00 \pm 2/14$ بود که تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$).

تعداد موارد مسواک زدن و رعایت بهداشت دهان نیز با کاهش کلونیزاسیون *Candida* در هر دو گروه ارتباط معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$).

گونه‌های *Candida* در افراد گروه مورد، *Candida albicans* با ۱۶ مورد (۴۲/۱۰ درصد)، *Candida krusei* با ۱ مورد (۲/۶۳ درصد) و *Candida kefir* با ۲ مورد (۵/۳۰ درصد) بود؛ اما در گروه شاهد، تنها *Candida albicans* با فراوانی ۱۰ مورد (۲۶/۳۱ درصد) و *Candida kefir* با فراوانی ۱ مورد (۲/۶۳ درصد) مشاهده شد.

در شکل‌های ۱ و ۲ نتایج انجام RFLP-PCR و الکتروفورز محصولات و مقایسه‌ی آن در دو گروه قابل مشاهده است. با وجود استفاده از آنزیم HinfI، *Candida dubliniensis* در هیچ یک از دو گروه مورد و شاهد دیده نشد.



شکل ۲. (الف): الکتروفورز محصولات ITS-RFLP (Internal transcribed spacer- Restriction fragment length polymorphism) با آنزیم **HinfI** تعدادی از جدایه‌ها: نشانگر **50 bp** بوده و چاهک‌های ۱-۶ مربوط به تعدادی از نمونه‌های افراد گروه‌های مورد و شاهد می‌باشد (چاهک‌های ۱-۴: *Candida albicans*. چاهک ۵: *Candida krusei*. چاهک ۶: *Candida kefir*). (الف): الکتروفورز محصولات ITS-RFLP با آنزیم **MSPI** تعدادی از جدایه‌ها: نشانگر **50 bp** بوده و چاهک‌های ۱-۶ مربوط به تعدادی از نمونه‌های افراد گروه‌های مورد و شاهد می‌باشد (چاهک‌های ۱-۴: *Candida albicans*. چاهک ۵: *Candida krusei*. چاهک ۶: *Candida kefir*).

با تعداد کلنی جدا شده از دهان دو گروه مورد مطالعه نداشت؛ این یافته، با مطالعه‌ی **Arendorf** و **Walker** همخوانی دارد. مصرف سیگار با تغییر در سلول‌های اپی‌تلیال دهان و کاهش سلول‌های لانگرهانس و لکوسیت‌های دهان، موجب فراهم آوردن کلونیزاسیون قارچ می‌شود (۲۲-۲۳). مطالعه‌ی **Shin** و همکاران بر روی دو گروه ۱۸۰ نفری مصرف کننده و غیر مصرف کننده سیگار، حاکی از شدت کلونیزاسیون *Candida* در گروه مصرف کننده‌ی سیگار نسبت به گروه غیر مصرف کننده‌ی سیگار می‌باشد که با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد (۲۴).

در مطالعه‌ی طاهری سروتین و همکاران نشان داده شد که از ۳۷ نفر مصرف کننده‌ی سیگار، ۲۷ نفر دارای کلونیزاسیون *Candida* می‌باشند و اختلاف معنی‌داری بین تعداد گونه‌های *Candida albicans*، *Candida glabrata*، *Candida krusei* و *Candida tropicalis* در حفره‌ی دهانی افراد مصرف کننده‌ی سیگار و غیر مصرف کننده‌ی سیگار وجود دارد (۲۵).

اگر چه در مطالعه‌ی حاضر نیز *Candida albicans* در هر دو گروه بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد، اما با وجود استفاده از آنزیم‌های محدودالایز **Msp I** و **Hinf I**، *Candida glabrata* و *Candida dubliniensis* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری نهایی این که مصرف سیگار از عوامل مستعد کننده، جهت تسهیل رشد گونه‌های *Candida* در دهان می‌باشد و رعایت

گونه‌های *Candida* دارای سیستم آنزیمی می‌باشد که قادرند هیدروکربن‌های آروماتیک در دود سیگار را به ترکیبات کارسینوژن تبدیل نمایند (۲۰). مطالعات زیادی نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین شدت کلونیزاسیون *Candida* در دهان افراد مصرف کننده‌ی و غیر مصرف کننده‌ی سیگار وجود دارد. تعیین میزان دقیق حضور *Candida albicans* در حفره‌ی دهان، ارتباط به عوامل متعددی همانند سن، میزان سلامت میزبان، آناتومی حفره‌ی دهان و سلامت دندان‌ها دارد (۱۸).

Arendorf و **Walker** بر روی دو گروه ۵۴ نفری مصرف کننده و غیر مصرف کننده‌ی سیگار مطالعه و بیان نمودند که میزان *Candida* در دهان افراد ناقل که به روش کشت ارگانیزم تأیید شده بود، به طور معنی‌داری در افراد مصرف کننده‌ی سیگار بیش از افراد غیر مصرف کننده‌ی سیگار گزارش شده است. همچنین، در این مطالعه میانگین pH دهان افراد ناقل *Candida*، کمتر ($6/6 \pm 0/3$) از میانگین pH دهان افراد غیر ناقل ($6/8 \pm 0/3$) بوده است (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان کلونیزاسیون *Candida albicans* در دهان افراد مصرف کننده‌ی سیگار بیش از افراد غیر مصرف کننده‌ی سیگار مشاهده شد؛ به طوری که تعداد نخ مصرفی، قند بزاق و نیز تعداد موارد استفاده از مسواک در روز در افراد مصرف کننده‌ی سیگار، تفاوت قابل ملاحظه و معنی‌داری به دنبال داشت. همچنین، در مطالعه‌ی اخیر میانگین میزان pH در دو گروه، ارتباط معنی‌داری

Candida dubliniensis به عنوان فلور دهان جدا نگردید.

بهداشت دهان همانند مسواک زدن، تعداد نخ مصرفی سیگار، pH و قند بزاق در میزان کلونیزاسیون مخمر مؤثر می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی مرتبط با پایان‌نامه‌ی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره طرح ۳۹۳۲۷۲ می‌باشد.

همچنین در این مطالعه، مهم‌ترین گونه‌ی مخمیری جدا شده از دهان افراد مصرف‌کننده و غیر مصرف‌کننده‌ی سیگار، گونه‌ی *Candida albicans* بود و گونه‌های *Candida glabrata* و

References

- Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994; 97(4): 339-46.
- Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, et al. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003; 46(11-12): 471-8.
- Kaminishi H, Hagihara Y, Hayashi S, Cho T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1986; 53(2): 312-6.
- Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res* 2001; 35(2): 149-55.
- Soysa NS, Ellepola AN. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis* 2005; 11(5): 268-73.
- Allen CM, Beck FM. Differences in mucosal reaction related to *Candida albicans* isolates. *J Oral Pathol* 1987; 16(2): 89-93.
- Parvinen T. Stimulated salivary flow rate, pH and lactobacillus and yeast concentrations in non-smokers and smokers. *Scand J Dent Res* 1984; 92(4): 315-8.
- Darwazeh AM, Al-Dwairi ZN, Al-Zwairi AA. The relationship between tobacco smoking and oral colonization with *Candida* species. *J Contemp Dent Pract* 2010; 11(3): 017-24.
- Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1999; 34(1): 25-33.
- Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 1.
- Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML, Green JA, Dooley DP. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4768-70.
- Niimi K, Shepherd MG, Cannon RD. Distinguishing *Candida* species by beta-N-acetylhexosaminidase activity. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2089-97.
- Hoffman CS. Preparation of yeast DNA. *Curr Protoc Mol Biol* 2001; Chapter 13: Unit13.
- Barns SM, Lane DJ, Sogin ML, Bibeau C, Weisburg WG. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol* 1991; 173(7): 2250-5.
- Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55(4): 122-5.
- Farasat A, Ghahri M, Mirhendi H, Beiraghi S. Identification of candida species screened from catheter using patients with PCR-RFLP method. *Euro J Exp Bio* 2012; 2(3): 651-6.
- Zahir RA, Himratul-Aznita WH. Distribution of *Candida* in the oral cavity and its differentiation based on the internally transcribed spacer (ITS) regions of rDNA. *Yeast* 2013; 30(1): 13-23.
- Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10(3): 359-83.
- Lundman BM, Asplund K, Norberg A. Smoking and metabolic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med* 1990; 227(2): 101-6.
- Hsia CC, Sun TT, Wang YY, Anderson LM, Armstrong D, Good RA. Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzylnitrosamine from its precursors by *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(3): 1878-81.
- Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 1980; 25(1): 1-10.
- Macgregor ID. Effects of smoking on oral ecology. A review of the literature. *Clin Prev Dent* 1989; 11(1): 3-7.
- Arendorf TM, Walker DM. Tobacco smoking and denture wearing as local aetiological factors in median rhomboid glossitis. *Int J Oral Surg* 1984; 13(5): 411-5.
- Shin ES, Chung SC, Kim YK, Lee SW, Kho HS. The relationship between oral *Candida* carriage and the secretor status of blood group antigens in saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(1): 48-53.
- Taheri Sarvtin M, Farhang Zand Parsa A, Kordbacheh P, Hashemi J, Mahmoudi M, Daie R, et al. The comparison of oral candida flora in smokers and non-smokers. *J Arak Univ Med Sci* 2010; 13(1): 78-82. [In Persian].

Identification of Candida Species in Oral Cavity of Smokers and Nonsmokers

Mohammad Reza Javaheri¹, Faezeh Mohammadi PhD², Mostafa Chadeganipour PhD³,
Shahram Nekoian⁴, Parvin Dehghan PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Candida albicans is the most common fungal species isolated from the oral cavity. Oral candidiasis is due to biofilm formation and an overgrowth of Candida species. Cigarette smoking can affect Candida colonization of the oral cavity. This study aimed to investigate the presence and identification of Candida species isolated from oral cavity in smokers and nonsmokers individuals.

Methods: 76 oral cavity and saliva samples were collected during March 2014 to September 2015 from two groups of smokers (n = 38; mean age: 48.50 ± 9.76 years) and nonsmokers (n = 38; mean age: 44.68 ± 10.79 years) as the control group. The swabs were cultured on sabouraud dextrose agar (SDA) media and then, pure colonies were picked to transfer on CHROMagar candida. Likewise, the saliva samples were collected from the both groups for the measurement of salivary glucose and pH. The identification of candida species was completed using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method.

Findings: The incidence frequencies of Candida albicans, Candida Kefyr and Candida krusei were 42.10%, 5.30% and 2.63%, and 26.31%, 2.63% and 0.0% in smoker and nonsmoker groups, respectively. However, Candida dubliniensis was not detected from the oral cavities in both two groups.

Conclusion: At the present study, the colonization of Candida albicans in smokers was more prevalent compared to nonsmokers. The amount of salivary glucose, the number of cigarette smoked per day and the oral hygiene status were the most important predisposing factors for candida colonization in the mouth.

Keywords: Oral Candidiasis, Candida species, Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Citation: Javaheri MR, Mohammadi F, Chadeganipour M, Nekoian Sh, Dehghan P. **Identification of Candida Species in Oral Cavity of Smokers and Non-Smokers.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2105-10

1- MSc Student, Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Public Health AND Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Department of Cellular and Molecular Biology, Isfahan Province Health Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Assistant Professor, Department of Mycology and Parasitology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Parvin Dehghan PhD, Email: dehghan@med.mui.ac.ir

اثرات درمانی افزودن ویتامین D به اینترفرون بتا ۱a در بیماران مبتلا به Multiple Sclerosis

دکتر مسعود اعتمادی^۱، زهرا توسلی کفرانی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: متابولیت‌های ویتامین D در سیگنال‌های ایمنی که منجر به سرکوب و تنظیم مکانیسم‌های خود ایمنی و بیماری‌های التهابی می‌شوند، نقش دارد. بنا بر این، درمان با ویتامین D می‌تواند یک روش با ارزش برای درمان بیماری‌های خود ایمنی و التهابی باشد. این مطالعه، با هدف بررسی تأثیر درمان با ویتامین D و اینترفرون بتا ۱a در مقایسه با اینترفرون بتا ۱a به تنهایی در بیماران مبتلا به MS انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی تصادفی، ۵۷ بیمار مبتلا به MS به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه برای بررسی اثرات کلینیکی ویتامین D، بعد از ۶، ۱۲ و ۲۴ ماه، تحت درمان با ویتامین D و اینترفرون بتا ۱a (سینوکس، ساخت شرکت سینازل ایران) قرار گرفتند و گروه دیگر فقط اینترفرون بتا ۱a دریافت نمودند. در این مطالعه، یافته‌های MRI (Magnetic resonance imaging)، تعداد عود و معیار EDSS (Expanded disability status scale) در هنگام شروع مطالعه، ۱۲ و ۲۴ ماه بعد از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفت. نوع آنالیز آماری بسته به نوع نتایج مورد اندازه‌گیری متفاوت بود.

یافته‌ها: بیمارانی که با ویتامین D درمان شدند، بعد از دو سال درمان با این دارو، نمره‌ی EDSS پایین‌تر ($P = ۰/۰۱۴$)، میزان عود کمتر ($P = ۰/۲۴۰$) و تعداد میانگین ضایعات (GE) Gradient-echo ($P = ۰/۰۰۱$) از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: ویتامین D یک راه درمانی کمکی مناسب برای درمان بیماران مبتلا به MS می‌باشد. نقش این دارو در درمان بیماری‌های خود ایمنی بایستی در تحقیقات بالینی مورد توجه بیشتری قرار گیرد. نتایج این پژوهش در بیماران مبتلا به MS نشان داد که سطح ویتامین D می‌تواند عامل پیش‌گویی کننده‌ی مناسبی برای شدت بیماری MS باشد. در نهایت، اگر چه ویتامین D نمی‌تواند یک عامل قابل ملاحظه به عنوان علت به وجود آمدن بیماری MS باشد، اما می‌تواند به عنوان یک عامل محیطی بالقوه در تشدید این بیماری در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: Multiple sclerosis، ویتامین D، اینترفرون بتا-۱a، خود ایمنی، عود، ضایعات

ارجاع: اعتمادی فر مسعود، توسلی کفرانی زهرا. مقایسه‌ی اثرات درمانی افزودن ویتامین D همراه به اینترفرون بتا ۱a در بیماران مبتلا به Multiple Sclerosis. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۲): ۲۱۱۹-۲۱۱۱

مقدمه

از آن جایی که گمان می‌رود MS به طور اساسی یک اختلال خود ایمنی است که بر سیستم عصبی مرکزی (CNS) یا Central nervous system تأثیر می‌گذارد، اکثر درمان‌ها از داروهای سرکوب کننده‌ی ایمنی استفاده می‌کنند. نقش تعدیل کننده‌های ایمنی در درمان بیماری MS در روش‌های جایگزین برای کنترل علائم MS نادیده گرفته نشده است. به دلیل ارتباط ظاهری ویتامین D با این بیماری و نقش طبیعی آن در تعدیل ایمنی بدن، این ویتامین به طور معمول در درمان بیماری MS مؤثر بوده است (۱).

بیماری MS به هر دو عامل ژنتیک و محیطی بستگی دارد. نقش

MS (Multiple sclerosis) یک بیماری خود ایمنی عصبی و بسیار شدید می‌باشد که به غشای میلین حمله می‌کند و منجر به ناتوانی پیش‌رونده می‌گردد. علائم و مکانیسم این بیماری هنوز برای پزشکان شناخته شده نیست و بیماران را با گزینه‌های درمانی محدود باقی گذاشته است. این درمان‌ها اغلب متغیر و غیر قابل پیش‌بینی هستند. بسیاری از درمان‌های موجود، سلامت بیماران را به مخاطره می‌اندازند و ما را ناگزیر به استفاده از روش‌های جایگزین برای سرکوب این بیماری می‌کنند.

۱- استاد، گروه مغز و اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

Email: etemadifar@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر مسعود اعتمادی فر

بیشتر داده‌ها به کمبود ویتامین D به عنوان عامل اختلال احتمالی در پیشرفت بیماری، اشاره دارد. به نظر می‌رسد که همانند بیماری MS، بیماری التهابی روده (IBD یا Inflammatory bowel disease)، آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis)، لوپوس (Lupus)، بیماری خود ایمنی کبد، آترواسکلروز (Atherosclerosis) و آسم نیز تحت تأثیر کمبود ویتامین D می‌باشند (۱۳-۱۲). سیگنالینگ ویتامین D در بیماری‌های خود ایمنی و نیز بیماری‌های التهابی که به شدت از نظر بیوشیمیایی مرتبط هستند، درگیر است. بیماری MS همچنین با خطر افزایش استئوپروز مرتبط است. ادعا شده است که بیماران MS ممکن است زمانی در گذشته یا در حال حاضر، کمبود ویتامین D را تجربه کرده باشند (۱۴).

بنا بر این، محققان بر کاربرد این ویتامین در درمان MS تمرکز کرده‌اند و به دنبال راه‌های ارتقا و جایگزین برای روش‌های موجود هستند. این مطالعه یک مطالعه‌ی تجربی تصادفی دو سو کور بود که در آن ویتامین D با اینترفرون بتا ۱۸ (سینوکس) در درمان بیماران مبتلا به MS استفاده و تأثیر آن با سینوکس به تنهایی مقایسه شد.

روش‌ها

طی این تحقیق، ۵۷ بیمار دچار Relapsing-remitting MS (RRMS) مراجعه کننده به کلینیک MS بیمارستان الزهرای (س) اصفهان وارد مطالعه شدند. تمامی روش‌ها توسط کلینیک MS بیمارستان الزهرای (س) اصفهان از مهر ۱۳۹۱ تا مهر ۱۳۹۳ انجام شد که در مجموع حاصل ۲۴ ماه پی‌گیری می‌باشد. بررسی‌های آخرین بیمار مورد مطالعه در مهر ۱۳۹۳ به اتمام رسید.

معیارهای انتخاب بیماران برای این مطالعه، دستورالعمل بازبینی شده‌ی McDonald ۲۰۱۳، اطلاعات تکمیلی MRI، اطلاعات بالینی، نتایج آزمایشگاهی، سن ۶۵-۱۸ سال، عدم عود طی ۴۰ روز قبل از شروع مطالعه و EDSS (Expanded disability status scale) کمتر از ۳ بود. پیش از انجام تحقیق، کلیه‌ی بیماران با سینوکس (ساخت شرکت سیناژل ایران) به مدت ۴۰ روز تحت درمان قرار گرفتند.

معیارهای خروج از مطالعه، شامل اختلالات دیگر مشابه با MS و CIS (Clinically isolated syndrome) با در نظر گرفتن علائم و مکانیسم بیماری، درمان‌های دیگر سرکوب کننده و یا تعدیل کننده‌ی ایمنی به غیر از سینوکس که طی ۴ ماه گذشته استفاده شده بودند، استفاده از ویتامین D یا مکمل کلسیم طی ۴ ماه قبل از مطالعه، شرکت در مطالعات بالینی مشابه هم‌زمان با مطالعه یا طی سه ماه گذشته، داشتن اختلالات مرتبط با جذب، متابولیسم یا دفع ویتامین D، سطح کلسیم غیر طبیعی، بارداری و شیردهی بودند.

علاوه بر این، مشاهده‌ی مشکلات شدید مثل عملکرد غیر طبیعی

احتمالی برای ویتامین D در پاتوژنز بیماری MS، به عامل محیطی این بیماری بر می‌گردد. MS در بخش‌هایی که از خط استوا دورتر هستند، بیشتر شایع است. در این بخش‌ها، قرارگیری در معرض اشعه‌ی ماورای بنفش ضعیف‌تر و کمتر رایج است (۲). اشعه‌ی ماورای بنفش، باعث می‌شود که بدن ویتامین D تولید کند. این ارتباط، حاکی از آن است که بین سطح ویتامین D و پاتوژنز MS رابطه‌ی معکوس وجود دارد (۳). عوامل محیطی متنوعی بر بیماری MS تأثیر می‌گذارند. از بین این عوامل، احتمال می‌رود اشعه‌ی ماورای بنفش نسبت به عرض جغرافیایی به تنهایی یا عوامل فرهنگی که ممکن است در عرض‌های مختلف جغرافیایی مختلف رایج‌تر باشد، در بین عوامل محیطی متنوع که بر میزان MS تأثیر می‌گذارند، مؤثرترین عامل باشد (۴).

مطالعه‌ای بر روی دوقلوهایی که یک نفر از آن‌ها به بیماری MS مبتلا بود، انجام شد. در این مطالعه، عدم قرارگیری قبلی در مقابل نور خورشید با افزایش خطر ابتلا به بیماری MS در آینده ارتباط داشت (۵). وقتی که اشعه‌ی ماورای بنفش به پوست برخورد می‌کند، ۷-دهیدروکلسترول به کوله کلسیفرول تبدیل می‌شود و در نهایت، به ایجاد متابولیت فعال ویتامین D منجر می‌شود که این متابولیت، می‌تواند در بین تأثیر سایر عوامل، تأثیر ایمنونولوژیک داشته باشد (۶).

برای فهمیدن نقشی که ویتامین D می‌تواند در MS داشته باشد، به طور کلی لازم است نقش آن در سیستم ایمنی روشن شود. متابولیت ویتامین D می‌تواند بیان ژن و بدین ترتیب بیان پروتئین را تغییر دهد. یک مثال در این زمینه، توانایی اتصال به گیرنده‌های درون سلولی ویتامین D (VDR یا Vitamin D receptor) می‌باشد (۷). این امر، مکانیسمی را فراهم می‌کند که با آن، ویتامین D می‌تواند نظم ایمنی سازگار و ذاتی، در سلول‌های ایمنی که حاوی اهداف این مسیر واکنش هستند، ایجاد کند. برخی موارد نیز دلالت بر تأثیر پلی‌مورفیسم‌های VDR بر MS دارند (۸). تأثیر ویتامین D در پیش‌گیری و درمان خود ایمنی در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است. محققین در حال حاضر، در حال بررسی مؤثرترین آنالوگ این ویتامین با کمترین عوارض جانبی هستند (۹). همچنین، مدل‌های حیوانی مفید بوده‌اند. اعمال ویتامین D در EAE (Experimental autoimmune encephalitis) شدت علائم را در موش‌ها کاهش می‌دهد (۱۰).

ویتامین D در سایر بیماری‌های خود ایمنی نیز مؤثر است؛ این امر، عملکرد این ویتامین را با مکانیسم خود ایمنی مرتبط می‌سازد. همبستگی ویتامین D و عرض جغرافیایی را نیز در بیماری‌های Parkinson و Alzheimer، می‌توان دید که به رابطه‌ی احتمالی بین این سه بیماری با ویتامین D اشاره دارد (۱۱).

شروع درمان جهت تعیین ضایعات انهناس شونده با گادولینیوم و ضایعات جدید MRI در تصاویر T2 انجام شد.

یک نورولوژیست معتبر که از تفاوت درمان دو گروه بیماران و یافته‌های بالینی اطلاع نداشت، تصاویر MRI را ارزیابی کرد. پارامتر دوم تعداد عودها بود که در این مطالعه عود، توسعه‌ی علائم نورولوژیک، تجمع ضایعات جدید یا بدتر شدن علائم قبلی تعریف می‌شود که حداقل ۲۴ ساعت طول بکشد و ارتباطی به تب و عفونت نداشته باشد. EDSS و رویدادهای پزشکی دیگر که طی هر معاینه ثبت می‌شدند نیز مورد توجه قرار گرفتند. باید توجه داشت که اگر چه در هر معاینه، این پارامترها مورد ارزیابی قرار گرفتند، اما همچنان عوارض درمان‌های جاری در نظر گرفته می‌شد تا ایمنی بیماران به خطر نیفتد. در صورت مشاهده‌ی عوارض، بیمار از مطالعه حذف می‌شد.

تمامی بیماران MS، کارکنان کلینیک MS بیمارستان الزهرای (س) اصفهان و کارکنان IMSS (Isfahan MS Society)، افراد ارزیابی‌کننده‌ی تصاویر MRI و نورولوژیست‌ها در مورد تفاوت گروه‌های دریافت‌کننده‌ی درمان‌های مختلف و یافته‌های بالینی، تا زمان اتمام مدت ۲۴ ماهه‌ی مطالعه بی‌اطلاع بودند. در طول این دوره، ارتباط بین بیماران و این افراد (مگر در صورت بروز عوارض درمان)، ممنوع گردید.

تحلیل آماری بر اساس اصل دست‌یابی به درمان انجام شد. بنا بر این، تمامی آزمون‌ها متناسب با متغیرهای مورد نظر انجام شد. آزمون‌های t ، χ^2 و Fisher's exact اعمال شدند. بدین ترتیب، دو گروه از نظر سن، جنسیت و سابقه‌ی خانوادگی MS همگن شدند. نتایج به دست آمده در ابتدای درمان، ۶، ۱۲ و ۲۴ ماه پس از شروع درمان در دو گروه با استفاده از آزمون t با هم مقایسه گردیدند. آزمون Repeated measures ANOVA استفاده شد تا دو گروه را با توجه به تغییر EDSS در طی تحقیق مقایسه کند.

تحلیل مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۵۷ بیمار مبتلا به MS مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. میانگین سن بیماران $28/5 \pm 7/4$ با دامنه‌ی ۱۸-۶۵ سال بود. ۷ نفر (۱۲/۳ درصد) از بیماران، مرد و ۵۰ نفر (۸۷/۷ درصد) زن بودند. ۳۳ نفر از این بیماران به همراه سینیوکس، ویتامین D_۳ دریافت کردند و ۲۴ نفر، تنها سینیوکس دریافت نمودند. در جدول ۱، توزیع متغیرهای دموگرافیک بر حسب نوع درمان آمده است. بر حسب آزمون t ، میانگین سن بیماران دو گروه اختلاف معنی‌دار نداشت.

سیستم عصبی، متابولیک، غددی، کبدی، هماتولوژیک، کلیوی یا قلبی بیماران منجر به خروج فوری آن‌ها از مطالعه گردید. همچنین، مصرف هیدروکلروتیازید، باربیتورات، فنی‌توئین و دیژیتال برای تمامی بیماران شرکت‌کننده در مطالعه ممنوع گردید. به دلیل نقش میزان و طول مدت قرارگیری در معرض نور خورشید در تولید ویتامین D، تمامی بیماران از مناطق جغرافیایی مشابه استان اصفهان (شهر اصفهان) انتخاب شدند.

روش اجرای تحقیق طبق کنفرانس بین‌المللی ICH-GCP (International Conference on Harmonization of Good Clinical Practice) تحت کنترل قرار گرفت (۱۶-۱۵). پس از بررسی ماهیت مطالعه و مشورت بیماران با نورولوژیست خود، رضایت‌نامه‌ی کتبی از تمامی بیماران کسب شد. دستورالعمل مطالعه‌ی حاضر توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تأیید رسید. این مطالعه در مرکز ثبت آزمایش‌های بالینی ایران به ثبت رسید.

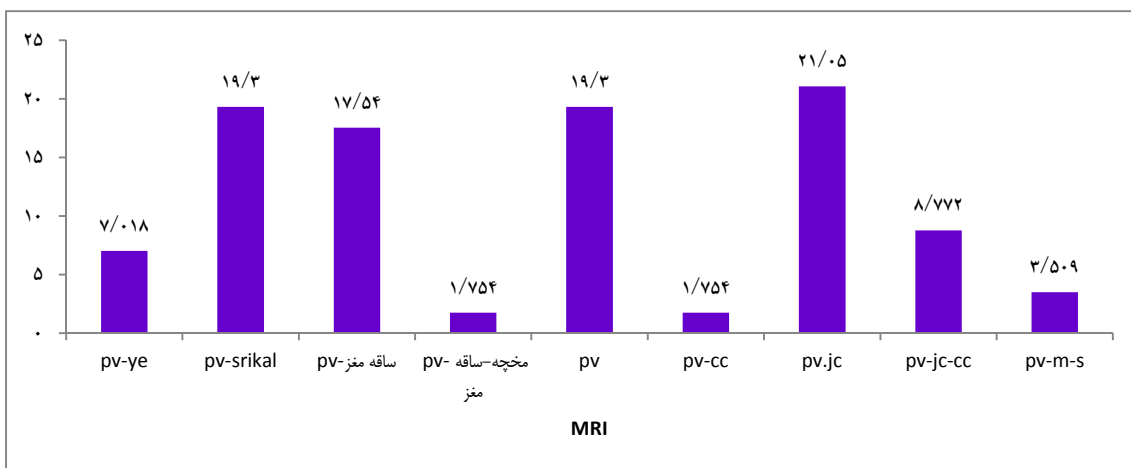
در ابتدای مطالعه، ۷۰ بیمار واجد شرایط انتخاب شدند. در غربال‌گری اولیه، ۱۲ نفر از آن‌ها به خاطر نداشتن معیارهای ورود به تحقیق یا عدم پذیرش خود بیمار، از مطالعه حذف شدند. به طور کلی، مجموع ۵۸ بیمار مبتلا به MS در مطالعه وارد شدند و مطالعه را بدون مشکل ادامه دادند؛ به جز یک بیمار، که به خاطر پیچیدگی درمان حذف شد.

بیماران طبق جنسیت و دوره‌ی بیماری طبقه‌بندی شدند و سپس بر اساس انتخاب تصادفی ۱:۱ به دو گروه تقسیم شدند: گروه الف که فقط سینیوکس دریافت می‌کردند و گروه ب که سینیوکس به همراه کلسیم خوراکی دریافت می‌کردند. بیمارانی که به طور تصادفی برای دریافت ویتامین D_۳ انتخاب می‌شدند، ۷۰۰۰ واحد روزانه برای ۴ هفته ویتامین دریافت کردند و در صورت تحمل این دز ویتامین D_۳، بیماران ۱۴۰۰۰ واحد روزانه برای ۹۲ هفته‌ی باقی‌مانده دریافت کردند. ویتامین D_۳ به صورت خوراکی هر روز صبح با صبحانه تجویز شد. انتخاب تصادفی با استفاده از برنامه‌ی کامپیوتری پیش از شروع مطالعه انجام شد. نورولوژیست‌هایی که در معاینات منظم مطالعه پس از ۶، ۱۲ و ۲۴ ماه همکاری می‌کردند، اطلاعی در مورد این که کدام گروه سینیوکس به تنهایی و کدام گروه سینیوکس به همراه کلسی‌تریول دریافت می‌کردند، نداشتند. شایان ذکر است که در صورت ضرورت، معاینات پیش‌بینی نشده انجام می‌شد. یک ماه قبل از شروع مطالعه، از بیماران خواسته شد برای دادن سوابق پزشکی شامل داروهای قبلی و ویژگی‌های نورولوژیک و انجام معاینات فیزیکی و نورولوژیک، به مرکز MS اصفهان مراجعه کنند. پارامترهایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، شامل یافته‌های MRI (Magnetic resonance imaging) مغزی و تعداد عود بودند. MRI مغزی با گادولینیوم در شروع مطالعه، ۱۲ و ۲۴ ماه بعد از

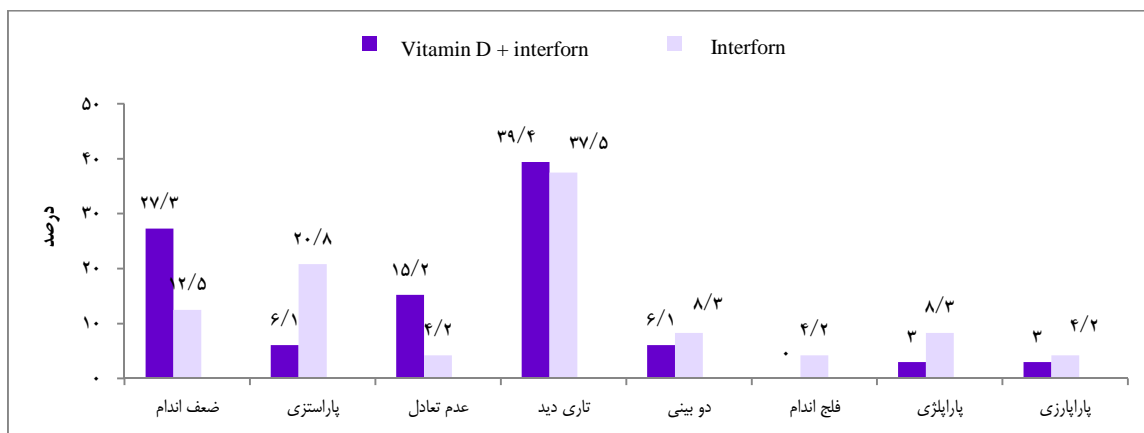
همچنین، بر حسب آزمون‌های χ^2 و Fisher's exact، توزیع فراوانی جنس، تحصیلات، وضعیت تأهل و سابقه‌ی فامیلی MS در دو گروه اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0/050$).
 در شکل‌های ۱ و ۲، به ترتیب درصد فراوانی یافته‌های MRI و نیز درصد فراوانی اولین علامت MS در دو گروه در بیماران تحت مطالعه آمده است.

جدول ۱. توزیع متغیرهای دموگرافیک در دو گروه

متغیر	گروه	ویتامین D به همراه اینترفرون	اینترفرون	مقدار P
سن		۲۹/۴ ± ۸/۵	۲۷/۳ ± ۵/۶	۰/۳۱
جنس	مرد	۵ (۱۵/۲)	۲ (۸/۳)	۰/۶۹
	زن	۲۸ (۸۴/۸)	۲۲ (۹۱/۷)	
تحصیلات	زیر دیپلم	۷ (۲۱/۲)	۱ (۴/۲)	۰/۲۱
	دیپلم	۱۶ (۴۸/۵)	۱۴ (۵۸/۳)	
	دانشگاهی	۱۰ (۳۰/۳)	۹ (۳۷/۵)	
وضعیت تأهل	متأهل	۱۹ (۵۷/۶)	۱۷ (۷۰/۸)	۰/۳۱
	مجرد	۱۴ (۴۲/۴)	۷ (۲۹/۲)	
سابقه‌ی فامیلی Multiple sclerosis	ندارد	۳۰ (۹۰/۹)	۲۳ (۹۵/۸)	۰/۱۵
	دارد	۳ (۹/۱)	۱ (۴/۲)	



شکل ۱. درصد فراوانی یافته‌های MRI (Magnetic resonance imaging) در بیماران مورد مطالعه

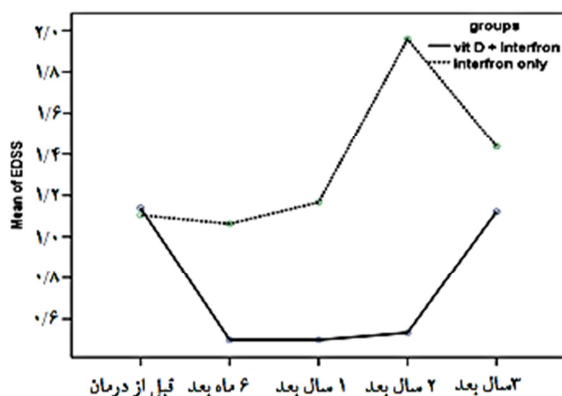


شکل ۲. درصد فراوانی اولین علامت MS (Multiple sclerosis) در دو گروه

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار شاخص EDSS (Expanded disability status scale) در قبل و بعد از درمان در دو گروه

زمان	گروه	ویتامین D و اینترفرون	اینترفرون	مقدار P
زمان تشخیص		۱/۱۴ ± ۰/۳۲	۱/۱۰ ± ۰/۲۱	۰/۷۸۰
۶ ماه بعد		۰/۵۰ ± ۰/۶۳	۱/۰۶ ± ۰/۵۴	۰/۰۰۱
۱ سال بعد		۰/۵۰ ± ۰/۶۳	۱/۱۷ ± ۰/۶۰	< ۰/۰۰۱
۲ سال بعد		۰/۵۳ ± ۰/۷۶	۱/۱۸ ± ۲/۱۰	۰/۰۱۱
زمان مطالعه		۱/۱۲ ± ۰/۴۸	۱/۴۴ ± ۰/۵۴	۰/۰۱۴
				۰/۰۰۱

نمود (۱۲/۱) در مقابل ۲۹/۲ درصد) و طبق آزمون Fisher's exact اختلاف دو گروه معنی‌دار نبود ($P = ۰/۱۷۰$). دو سال بعد از درمان، موارد عود در گروه ویتامین D و سینوکس ۶ مورد و در گروه سینوکس تنها ۹ مورد بود (۱۸/۲ در مقابل ۳۷/۵ درصد)؛ اما طبق آزمون χ^2 تفاوت دو گروه معنی‌دار نبود ($P = ۰/۱۳۰$). در شکل ۴، تعداد دفعات عود در دو گروه آمده است.



شکل ۳. میانگین شاخص Expanded disability status scale (EDSS) قبل از درمان تا زمان انجام مطالعه در دو گروه

میانگین فاصله‌ی زمانی بین تاریخ تشخیص تا آخرین حمله‌ی بیماری در گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین D و سینوکس، $۶/۲ \pm ۲/۰$ و در گروه دریافت‌کننده‌ی سینوکس، $۱/۸ \pm ۵/۵$ ماه بود و طبق آزمون t ، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P = ۰/۸۱۰$).

بحث

نتایج نشان داد که ویتامین D در درمان بیماران MS تأثیر مثبت و محافظ دارد. در پژوهش حاضر، در مجموع ۵۷ بیمار در طی دو سال مورد مطالعه قرار گرفتند. گروهی از بیماران تنها سینوکس و گروه دیگر سینوکس به همراه ویتامین D در طی دوره‌ی درمان دریافت نمودند. در این مطالعه، سطح ویتامین D به طور معنی‌داری در گروه

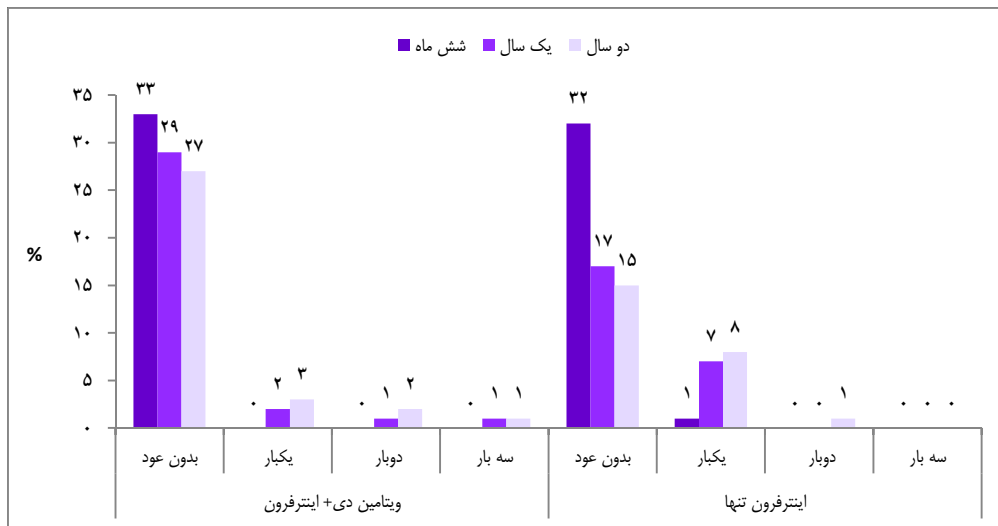
برابر نتایج به دست آمده، اولین و شایع‌ترین علامت بیماری MS در دو گروه مورد مطالعه، تاری دید بود؛ به طوری که در ۱۳ نفر از گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین D و سینوکس و در ۹ نفر از گروه دریافت‌کننده‌ی سینوکس، تاری دید مشاهده شد (۳۹/۴ در مقابل ۳۷/۵ درصد) و طبق آزمون Fisher's exact، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت ($P = ۰/۲۲۰$) (شکل ۱).

میانگین سطح سرمی ویتامین D در قبل از درمان در دو گروه ویتامین D و سینوکس و سینوکس تنها، به ترتیب $۱۴/۱۲ \pm ۶/۴۰$ و $۱۶/۰۳ \pm ۷/۳۰$ نانوگرم در میلی‌لیتر بود و طبق آزمون t ، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت ($P = ۰/۳۰۰$). همچنین، میانگین سطح سرمی ویتامین D بعد از درمان در دو گروه، به ترتیب $۱۶/۹۰ \pm ۳۸/۹۸$ و $۱۹/۰۰ \pm ۷/۶۰$ نانوگرم در میلی‌لیتر و تفاوت بین دو گروه معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$).

میانگین شاخص EDSS در زمان تشخیص در دو گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین D و سینوکس و سینوکس تنها، به ترتیب $۱/۱۴ \pm ۰/۳۲$ و $۱/۱۰ \pm ۰/۲۱$ بود و طبق آزمون t ، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت ($P = ۰/۷۸۰$)؛ اما میانگین این شاخص، از ۶ ماه بعد از شروع درمان تا زمان انجام مطالعه در دو گروه تفاوت معنی‌دار داشت؛ به طوری که شاخص EDSS در زمان مطالعه در دو گروه تحت درمان با ویتامین D و سینوکس و سینوکس تنها، به ترتیب $۱/۱۲ \pm ۰/۴۸$ و $۱/۴۴ \pm ۰/۵۴$ بود و طبق آزمون t ، تفاوت دو گروه، معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۱۴$).

در جدول ۲ و شکل ۳، میانگین شاخص EDSS در از زمان تشخیص تا زمان انجام مطالعه در دو گروه آمده است. انجام آزمون Repeated measures ANOVA نیز نشان داد که تغییرات EDSS طی مدت درمان، در دو گروه اختلاف معنی‌دار داشت.

بررسی عود در بیماران تحت مطالعه نشان داد که در ۶ ماه بعد از شروع درمان، بیماری در ۱ نفر (۴/۲ درصد) از گروه سینوکس تنها عود نمود ($P = ۰/۴۲۰$). در یک سال بعد از درمان، بیماری در ۴ نفر از گروه ویتامین D و سینوکس و ۷ نفر از گروه سینوکس تنها، عود



شکل ۴. فراوانی دفعات عود بیماری تا دو سال بعد از درمان در دو گروه

پژوهش، زنان باردار مبتلا به MS به عنوان زیر مجموعه‌ی جمعیت بیمار مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که آن‌ها نیز دچار کمبود ویتامین D هستند؛ اما سطح ویتامین D آن‌ها در زمان بارداری نسبت به زمانی که باردار نبودند، بالاتر بود (۲۷). این موضوع دال بر این است که ویتامین D در حقیقت در مقابل عود MS بیمار را محافظت می‌کند. تحقیقات قبلی نشان داده است که بارداری از عود بیماری MS ممانعت می‌کند. یک دلیل احتمالی این است که بارداری، میزان ویتامین D را افزایش می‌دهد که منجر به اثرات محافظتی آن در برابر بیماری MS می‌گردد. در حال حاضر، وجود ارتباط بین دز ویتامین D و تأثیرات درمانی در بیماری MS نامشخص است (۲۵). مطالعات حاضر، همچنین برای مشخص کردن این ارتباط و تعیین مناسب‌ترین دز ویتامین D برای کاهش پیشرفت بیماری MS در حال انجام است.

بیماران MS نسبت به جمعیت عمومی سطح خونی ویتامین D پایین‌تری دارند. همچنین، مشخص شده است که این بیماران، دچار کمبود ویتامین D هستند؛ اما در دوران بارداری سطح خونی ویتامین D بالاتری دارند (۲۷) و این امر، مشخص‌کننده‌ی این است که ویتامین D یک عامل محافظ برای ابتلا به بیماری MS می‌باشد. در مطالعات قبل مشخص شده است که بارداری یک عامل محافظ برای عود بیماری MS به شمار می‌رود. دلیل محتمل این است که سطح بالاتر ویتامین D در بیماران باردار، علت محافظت این بیماران در برابر عود این بیماری می‌باشد (۲۸).

سطوح بالاتر متابولیت ویتامین D ممکن است منجر به افزایش پاسخ ضد التهابی سلول‌های T regulatory شود (۲۹). در افراد سالم، مصرف ویتامین D باعث افزایش تولید اینترلوکین ۱۰ و کاهش

دریافت‌کننده‌ی این ویتامین و در مقایسه با ابتدای مطالعه افزایش یافت. بیماران دریافت‌کننده‌ی ویتامین D نسبت به گروه دیگر، به طور معنی‌داری نمره‌ی EDSS کمتری داشتند. گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین D، به طور معنی‌داری میزان عود کمتری را نشان دادند. همچنین، پس از ۲۴ ماه، این گروه کاهش معنی‌داری نیز در ضایعات Gradient-echo (GE) نشان دادند. بیماران دریافت‌کننده‌ی ویتامین D در مقایسه با گروه دیگر، میانگین پایین‌تری در تعداد NT2 تجربه کردند. به طور کلی، این نتایج نشان داد که ویتامین D نقش بسیار مهمی در کاهش پیشرفت بیماری MS دارد.

تحقیقات دیگر، نتایج مشابهی در مورد بیماران دریافت‌کننده‌ی ویتامین D را نشان دادند (۱۷). افزودن ویتامین D_۳ به سینوکس منجر به کاهش یافته‌های MRI شد (۱۸).

مقیاس شدت خستگی (FSS یا Fatigue severity scale) و میزان عود پس از ۴ ماه در بیماران مبتلا به MS دریافت‌کننده‌ی ویتامین D، در مقایسه با گروه دیگر که ویتامین D دریافت نکرده بودند، به میزان کمتری گزارش شده است (۱۹).

در جمعیت اطفال، افزایش دز ویتامین D با کاهش میزان عود در بیماران مبتلا به MS نسبت مستقیم داشت (۲۰). همچنین، بین افرادی که سطح ویتامین D بدن آن‌ها به طور طبیعی بیشتر بود، رابطه‌ی معکوس با احتمال عود بیماری MS وجود داشت (۲۱). در جامعه‌ی بیماران مبتلا به MS که سینوکس دریافت می‌کردند و سطح خونی بالاتری از ۲۵- هیدروکسی ویتامین D داشتند، سیر پیشرفت بیماری کمتر بود که با نتایج این مطالعه مطابقت داشت (۲۲-۲۵).

مطالعات گذشته نشان داده است که بیماران مبتلا به MS، سطح ویتامین D پایین‌تری نسبت به جمعیت عمومی دارند (۲۶). در یک

داروهای تعدیل کننده‌ی ایمنی مثل سینوکس نیستند، اهمیت دو چندان دارد. درمان با دزهای بالای ویتامین D بدون خطر نیست و بیماران که این درمان را دریافت می‌کنند، بایستی به طور منظم کنترل و نظارت شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای زهرا توسلی کفرانی به شماره‌ی طرح ۳۹۲۳۳۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی این دانشگاه و تمامی پزشکان مرکز آموزشی-درمانی الزهرای (س) اصفهان و پرسنل محترم مرکز MS این بیمارستان که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

Th ν (۱۷ helper T) می‌شود (۳۰) و هر دوی این عوامل به نظر می‌رسد که در درمان بیماری MS مؤثر باشند.

این پژوهش بیانگر نقش احتمالی ویتامین D در میزان ناتوانی‌های بیماران مبتلا به MS، می‌باشد. به نظر می‌رسد، کاهش سطح سرمی ویتامین D منجر به پیشرفت مکانیسم‌های خود ایمنی در بیماری MS و سایر بیماری‌های خود ایمنی می‌شود. با توجه به اهمیت ویتامین D، نقش این ویتامین در بیماری MS باید مورد توجه و بررسی بیشتری قرار بگیرد و برای پزشکانی که به طور مداوم به درمان بیماران مبتلا به MS می‌پردازند، شناسانده شود. در این بین، مطالعه‌ی اثر مصرف ویتامین D هم‌زمان با سایر روش‌های درمانی بیماران MS مانند استفاده از سینوکس از درجه‌ی اهمیت بالایی برخوردار است؛ به خصوص بررسی تأثیر ویتامین D در بیماران که قادر به مصرف

References

1. Harandi AA, Harandi AA, Pakdaman H, Sahraian MA. Vitamin D and multiple sclerosis. *Iran J Neurol* 2014; 13(1): 1-6.
2. Cantorna MT. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223(3): 230-3.
3. Mandia D, Ferraro OE, Nosari G, Montomoli C, Zardini E, Bergamaschi R. Environmental factors and multiple sclerosis severity: a descriptive study. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11(6): 6417-32.
4. Sloka S, Silva C, Pryse-Phillips W, Patten S, Metz L, Yong VW. A quantitative analysis of suspected environmental causes of MS. *Can J Neurol Sci* 2011; 38(1): 98-105.
5. Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, Mack TM. Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology* 2007; 69(4): 381-8.
6. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(12): 664-73.
7. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002; 296(5571): 1313-6.
8. Tizaoui K, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K. Association between vitamin D receptor polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Cell Mol Immunol* 2015; 12(2): 243-52.
9. Bouillon R, Verstuyf A, Branisteau D, Waer M, Mathieu C. Immune modulation by vitamin D analogs in the prevention of autoimmune diseases. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1995; 57(5): 371-85. [In Dutch].
10. Mowry EM. Vitamin D: evidence for its role as a prognostic factor in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011; 311(1-2): 19-22.
11. Millet P, Landel V, Virard I, Morello M, Feron F. Role of vitamin D in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Biol Aujourd'hui* 2014; 208(1): 77-88. [In French].
12. Wobke TK, Sorg BL, Steinhilber D. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front Physiol* 2014; 5: 244.
13. Smyk DS, Orfanidou T, Invernizzi P, Bogdanos DP, Lenzi M. Vitamin D in autoimmune liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37(5): 535-45.
14. Gupta S, Ahsan I, Mahfooz N, Abdelhamid N, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B. Osteoporosis and multiple sclerosis: risk factors, pathophysiology, and therapeutic interventions. *CNS Drugs* 2014; 28(8): 731-42.
15. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonized tripartite guideline: Guideline for Good Clinical Practice. *J Postgrad Med* 2001; 47(1): 45-50.
16. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013; 310(20): 2191-4.
17. Shaygannejad V, Janghorbani M, Ashtari F, Dehghan H. Effects of adjunct low-dose vitamin d on relapsing-remitting multiple sclerosis progression: preliminary findings of a randomized placebo-controlled trial. *Mult Scler Int* 2012; 2012: 452541.
18. Soilu-Hanninen M, Aivo J, Lindstrom BM, Elovaara I, Sumelahti ML, Farkkila M, et al. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon beta-1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83(5): 565-71.
19. Achiron A, Givon U, Magalashvili D, Dolev M, Liraz ZS, Kalron A, et al. Effect of Alfacalcidol on multiple sclerosis-related fatigue: A randomized, double-blind placebo-controlled study. *Mult Scler* 2015; 21(6): 767-75.
20. Mowry EM, Krupp LB, Milazzo M, Chabas D, Strober JB, Belman AL, et al. Vitamin D status is associated with relapse rate in pediatric-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67(5): 618-24.

21. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14(9): 1220-4.
22. Simpson S, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 68(2): 193-203.
23. Ascherio A, Munger KL, White R, Kochert K, Simon KC, Polman CH, et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol* 2014; 71(3): 306-14.
24. Smolders J, Hupperts R, Barkhof F, Grimaldi LM, Holmoy T, Killestein J, et al. Efficacy of vitamin D3 as add-on therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis receiving subcutaneous interferon beta-1a: a Phase II, multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Neurol Sci* 2011; 311(1-2): 44-9.
25. O'Connell K, Kelly S, Kinsella K, Jordan S, Kenny O, Murphy D, et al. Dose-related effects of vitamin D on immune responses in patients with clinically isolated syndrome and healthy control participants: study protocol for an exploratory randomized double-blind placebo-controlled trial. *Trials* 2013; 14: 272.
26. Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L, Han F, Wang H, et al. Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett* 2014; 570: 108-13.
27. Jalkanen A, Kauko T, Turpeinen U, Hamalainen E, Airas L. Multiple sclerosis and vitamin D during pregnancy and lactation. *Acta Neurol Scand* 2015; 131(1): 64-7.
28. Delvin E, Souberbielle JC, Viard JP, Salle B. Role of vitamin D in acquired immune and autoimmune diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 51(4): 232-47.
29. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol* 2008; 194(1-2): 7-17.
30. Allen AC, Kelly S, Basdeo SA, Kinsella K, Mulready KJ, Mills KH, et al. A pilot study of the immunological effects of high-dose vitamin D in healthy volunteers. *Mult Scler* 2012; 18(12): 1797-800.

Efficacy of Adding Vitamin D Supplementation to Interferon β -1 in Multiple Sclerosis

Masoud Etemadifar MD¹, Zahra Tavassoli-Kafrani²

Original Article

Abstract

Background: Vitamin D metabolites are involved in immunological signaling that leads to suppression and regulation of autoimmune and inflammatory pathways. Therefore, vitamin D supplementation may be a viable method for treating autoimmune or inflammatory diseases. This study aimed to investigate how treating with interferon beta-1 with vitamin D differs from treating with interferon beta-1 alone in patients with multiple sclerosis (MS).

Methods: In this phase II double-blind randomized clinical trial, 59 patients with multiple sclerosis receiving interferon β -1 were split into two groups, one supplemented with vitamin D, to study the clinical effects resulted after 6, 12, and 24 months. We used analysis of magnetic resonance imaging (MRI), evidence of clinical relapses, and expanded disability status scale (EDSS) scores at baseline, 12 and 24 months to perform statistical analysis. Type of statistical analysis varied based on the measured outcomes.

Findings: After 2 years of treatment, patients treated with vitamin D experienced decreased EDSS score ($P = 0.014$), decreased rate of relapse ($P = 0.240$), and decreased average number of gradient-echo (GE) lesions ($P < 0.001$).

Conclusion: Vitamin D is a viable way to supplement the treatment of multiple sclerosis and its role in autoimmune diseases needs to be further clinically investigated. Our results suggest that in a population of patients with multiple sclerosis, vitamin D levels are a good predictor of the severity of the disease. In conclusion, vitamin D may not be a significant factor to consider in the etiology of multiple sclerosis, but rather a possible environmental exacerbating factor in the progression of the disease.

Keywords: Multiple sclerosis, Vitamin D, Interferon beta-1, Autoimmunity, Relapse, Lesion

Citation: Etemadifar M, Tavassoli-Kafrani Z. Efficacy of Vitamin D supplementation into Interferon β -1 in Multiple Sclerosis. J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2111-9

1- Professor, Department of Neurology, 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

Corresponding Author: Masoud Etemadifar MD, Email: etemadifar@med.mui.ac.ir

استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 برای تشخیص ناپایداری میکروستلایت در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC)

نجمه فراهانی^۱، دکتر پروانه نیک‌پور^۲، دکتر محمدحسن امامی^۳، دکتر مرتضی هاشمزاده^۴، مهرداد زینلیان^۵،
دکتر رسول صالحی^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان‌های بدخیم کولورکتال، چه در صورت تکی و چه در صورت خانوادگی، اگر با افزایش میزان ناپایداری در میکروستلایت همراه باشند، پیش‌آگهی بهتری دارند، راهکار متفاوتی برای جراحی در آن‌ها اتخاذ می‌شود و پاسخ متفاوتی نسبت به داروی شیمی‌درمانی 5FU (Fluorouracil) خواهند داد. بنا بر این، امروزه برای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال ارثی و غیر ارثی، آزمایش سنجش وضعیت ناپایداری میکروستلایت انجام می‌شود. هدف این مطالعه، سنجش کارایی نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 در جمعیت بیماران مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC یا Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) کشور ایران بود. علاوه بر نشانگر پیش‌گفته، از دو روش بررسی وضعیت میکروستلایت با پنل ۵ نشانگری و استاندارد Promega و نیز آزمایش ایمونوهیستوشیمیایی استفاده شد.

روش‌ها: در این مطالعه، نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 و کیت استاندارد Promega از طریق روش PCR (Polymerase chain reaction) بر روی ۲۰ خانواده‌ی مبتلا به HNPCC ایرانی مورد سنجش قرار گرفت و آزمایش ایمونوهیستوشیمیایی نیز برای بررسی وضعیت ۴ پروتئین مهم دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در روش سنجش ناپایداری میکروستلایت از طریق پنل Promega و نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 به ترتیب ۸ (۴۰ درصد) و ۵ نمونه (۲۵ درصد) از ۲۰ نمونه وضعیت ناپایداری نشان دادند. در روش ایمونوهیستوشیمیایی نیز، ۷ نمونه از ۲۰ نمونه (۳۵ درصد) وضعیت کمبود پروتئین مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی را نشان دادند. در میان نشانگرهای مورد استفاده در کیت Promega، نشانگر BAT26 ناپایدارترین نشانگر بود و در هر ۸ نمونه، Microsatellite instability-high (MSI-H) تشخیص داده شده توسط کیت Promega ناپایداری نشان داد. نشانگرهای NR21 و NR24 در ۷ نمونه (۸۷/۵ درصد) ناپایداری نشان دادند و نشانگرهای BAT25 و MONO27 به ترتیب با نشان دادن ناپایداری در ۶ (۷۵/۰ درصد) و ۵ نمونه (۶۲/۵ درصد)، پایدارترین نشانگرها بودند.

نتیجه‌گیری: MT1XT20 در جمعیت ایتالیایی، به عنوان نشانگر تک نوکلئوتیدی مورد اعتماد ارزیابی شده است، اما این مسأله در رابطه با جمعیت ایرانی صدق نمی‌کند. در عوض، BAT26 با نشان دادن ناپایداری در تمام نمونه‌های MSI-H ارزیابی شده توسط کیت Promega، می‌تواند به عنوان نشانگری موثق و قابل مقایسه با پنل ۵ نشانگری Promega در جمعیت ایرانی در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: سرطان کولون ارثی غیر پولیپی، ناپایداری میکروستلایت، MT1XT20، تکرارهای شبه مونومورفیک

ارجاع: فراهانی نجمه، نیک‌پور پروانه، امامی محمدحسن، هاشمزاده مرتضی، زینلیان مهرداد، صالحی رسول. استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 برای تشخیص ناپایداری میکروستلایت در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان کولون ارثی غیر پولیپی (HNPCC). مجله

دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۲): ۲۱۲۰-۲۱۳۰

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۲- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات گوارش پورسینای حکیم، مؤسسه پژوهشی پورسینای حکیم و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۴- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
- ۵- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
- ۶- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رسول صالحی

مقدمه

سندرم Lynch که به عنوان سرطان کولون ارثی غیر پولیپي HNPCC یا Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) نیز شناخته می‌شود، شایع‌ترین شکل ارثی سرطان کولون (۱) با توارث اتوزومی غالب است (۲). در این سرطان ارثی، یک یا چند جهش در رده‌ی زاینده و در ژن‌های دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی (MMR یا Mismatch repair) رخ می‌دهد. این ژن‌ها عبارت از MLH1، MSH2، MSH6، MSH3 و PMS2 می‌باشند (۳).

در سال ۱۹۹۳ مشخص شد که فقدان عملکرد ژن‌های دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی، منجر به پدیده‌ی ناپایداری میکروستلایت در تومورهای دارای این نقص می‌گردد (۴-۵). توالی‌های میکروستلایت در سراسر ژنوم پراکنده‌اند و متشکل از تکرارهای ۱-۶ جفت بازی هستند و پلی مورفیسم بسیار بالایی را نشان می‌دهند (۶-۷). در برخی از تومورها، نیم یا بیش از نیمی از میکروستلایت‌ها دچار ناپایداری می‌شوند که تحت عنوان ناپایداری بالای میکروستلایت (Microsatellite instability high یا MSI-H) شناخته می‌شود. می‌توان گفت که سنجش پایداری میکروستلایت (Microsatellite instability testing) روشی بسیار خوب و آسان برای بررسی فقدان پروتئین‌های سیستم MMR می‌باشد (۸).

در بیماران مبتلا به سندرم Lynch، احتمال رخداد مجدد تومورهای کولون وجود دارد (۹) و این بیماران، علاوه بر تومور کولون در معرض خطر برای ابتلا به سایر تومورها نظیر تومور اندومتر و با احتمال کمتر تومورهای تخمدان، معده، مثانه، پانکراس و مغز می‌باشند. علاوه بر این، خانواده‌ی این افراد، در معرض خطر ابتلا به سرطان‌های مشابه هستند (۱). سرطان‌های کولونی که وضعیت ناپایداری میکروستلایت را نشان می‌دهند، نسبت به سایر سرطان‌های کولون، پیش‌آگهی بهتری دارند؛ اما در صورت استفاده از شیمی درمانی یاری‌گر 5FU (Fluorouracil) 5FU (5FU adjuvant chemotherapy) این پیش‌آگهی کاهش می‌یابد (۱۰-۱۱). همچنین، در این بیماران، شیوه‌ی جراحی متفاوتی اتخاذ می‌شود (۱۲).

بنا بر این، بررسی وضعیت ناپایداری میکروستلایت، یک روش مستقل پیش‌بینی کننده است که منجر به مدیریت بهتر سندرم Lynch خواهد شد و در اغلب موارد، به عنوان بهترین و اولین روش برای شناسایی این بیماران به کار گرفته می‌شود (۱۰، ۱۲). از آزمایش ایمنو هیستوشیمیایی (Immuno histo chemistry یا IHC) نیز برای بررسی وضعیت بیان ژن‌های دخیل در مسیر ترمیم ناجور جفت شدگی و غربال‌گری بیماران مبتلا به سندرم Lynch استفاده می‌شود. با این حال، به دلیل وجود برخی محدودیت‌ها در انجام آزمایش ایمنو هیستوشیمیایی، از آزمایش MSI (Microsatellite instability)

نیز در همراهی با آن استفاده می‌گردد (۱۴-۱۳).

در سال ۱۹۷۷ مؤسسه‌ی بین‌المللی سرطان (National cancer institute)، پنل پنج نشانگری Bethesda را برای بررسی وضعیت ناپایداری میکروستلایت ارایه نمود که متشکل از دو نشانگر تک نوکلئوتیدی و سه نشانگر دو نوکلئوتیدی بود (۱۵). در سال ۲۰۰۴ برای افزایش اعتبار پنل ارایه شده، پنلی متشکل از پنج نشانگر تک نوکلئوتیدی ارایه شد که پنل Promega نام گرفت (۱۶).

امروزه این پروتکل استاندارد، برای بررسی وضعیت بیماران مشکوک به سندرم Lynch که از طریق معیارهای آمستردام/ Bethesda (Amsterdam and/or Bethesda criteria) انتخاب شده‌اند، به کار می‌رود (۱۷-۱۸). به هر حال، این روش به دلیل نیاز به بررسی هم‌زمان چند نشانگر هزینه‌بر و زمان‌بر است و انجام آن در تمام آزمایشگاه‌ها امکان پذیر نیست (۱۹). بنا بر این، تلاش‌هایی برای یافتن روشی ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر با حساسیت و اختصاصیتی مشابه به پنل‌های چند نشانگری صورت گرفت و منجر به معرفی نشانگرهای تک نوکلئوتیدی مختلف در چندین مطالعه شد (۲۰-۲۱). از بین این نشانگرهای شبه مونو مورفیک، دو نشانگر BAT25 و BAT26 شناخته شده‌ترین نشانگرها هستند (۲۲، ۱۷).

در پژوهشی، چهار نشانگر تک نوکلئوتیدی PTHL3، SEC63، HPDMPK و U79260 معرفی شدند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر، نشانگر تک نوکلئوتیدی دیگری تحت عنوان CAT25 در منطقه‌ی ترجمه نشدنی 3' ژن CASP2 ارایه گردید (۲۴). نشانگر CAT25 در مقایسه با پنل استاندارد ارایه شده توسط مؤسسه‌ی بین‌المللی سرطان، حساسیت و اختصاصیت بالایی را نشان می‌داد (۲۴-۲۵).

Morandi و همکاران نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 را در منطقه‌ی ترجمه نشدنی 3' ژن MTIX ارایه کردند که در مقایسه با CAT25 و سایر نشانگرهای تک نوکلئوتیدی، از حساسیت و اختصاصیت بالاتری برخوردار بود (۲۶). هدف از این مطالعه، ارزیابی حساسیت و اختصاصیت نشانگر MT1XT20 در مقایسه با پنل Promega و آزمایش IHC در بیماران بود که از طریق معیار آمستردام II انتخاب شده بودند. در این مطالعه، بررسی وضعیت ناپایداری میکروستلایت از طریق پنل Promega به عنوان روش استاندارد طلایی (Gold standard method) اتخاذ شد.

روش‌ها

جمعیت مطالعه: از ۱۱۵۹ بیمار مبتلا به سرطان کورکتال از دو استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری که در مرکز تحقیقات پورسینای حکیم اصفهان ثبت نام به عمل آورده بودند، درخواست شد تا به پرسش‌نامه‌ی مربوط پاسخ دهند. این پرسش‌نامه، حاوی سؤالاتی در

نمونه‌های دارای ناپایداری در یک یا دو نشانگر و نمونه‌های فاقد ناپایداری در نشانگرها نیز در گروه نمونه‌های MSI-L/MSS (MSI-) قرار گرفتند.

ارزیابی وضعیت MSI با استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20: نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 از طریق واکنش PCR در نمونه‌های مبتلا به تومور و بافت سالم مجاور آن‌ها در حجم $25 \mu\text{l}$ و بر طبق شرایط زیر تکثیر شد: مخلوط واکنش PCR حاوی 100 ng از DNA، $2/5 \mu\text{l}$ از بافر 10X، $0/4 \text{ mM}$ از پرایمرهای 5'-CAGCTGTGCTCTCAGATGTA AAA-3' Forward و 5'-CCA AGTCCATATACCCAGTGA-3' Reverse، $0/5$ واحد آنزیم پلیمرز Taq، $0/2 \text{ mM}$ از هر dNTP (Deoxynucleotide triphosphate) و $1/5 \text{ mM}$ از MgCl_2 بود. سپس، تیوب‌ها در دستگاه PCR متعلق به شرکت آلمانی Eppendorf قرار گرفت و مراحل PCR انجام شد. دناتوراسیون اولیه در دمای 95°C و به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و با 30 چرخه 30 ثانیه‌ای در دمای 95°C ، 58°C و 72°C دنبال شد. مرحله پایانی طولی‌سازی نیز در دمای 72°C و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. انتهای ۵ پرایمر Reverse، توسط رنگ فلورسنت Cy5 نشان‌دار شده بود. اندازه‌ی دقیق هر کدام از آلل‌ها توسط دستگاه Automated laser fluorescence express DNA sequencer (ALF express) و نرم‌افزار AlleleLinks (توصیه شده توسط شرکت سازنده‌ی دستگاه) و از طریق مقایسه با نشانگر اندازه‌ی (Size marker) استاندارد محاسبه گردید.

انجام آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی: از هر کدام از نمونه‌های مبتلا به تومور و بافت طبیعی مجاور آن‌ها، حداقل ۴ اسلاید تهیه شد. ارزیابی بیان پروتئین‌های سیستم MMR شامل MSH1، MLH1، MSH6 و PMS2 بر روی برش‌هایی با ضخامت $2-10 \mu\text{m}$ انجام گرفت. پس از پارافین‌زدایی نمونه‌ها در گزین و ریه‌دراسیون آن‌ها با استفاده از اتانول 100 ، 90 و 70 درصد، مرحله‌ی بازیابی آنتی‌ژن در اتاق فشار و در مایکروویو با استفاده از EDTA-Tris (Ethylenediaminetetraacetic acid) ($\text{pH} = 9$) و به مدت 20 دقیقه انجام شد. سپس، برش‌ها در dH_2O (Distilled water) شستشو شدند. نمونه‌ها به منظور خنثی‌سازی پروکسیدازهای اندوژن برای مدت حداقل ۵ دقیقه در هیدروژن پراکسیداز انکوبه شدند و سپس دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در TBS (Tris-buffered saline) شسته شدند. برای جلوگیری از رنگ‌آمیزی غیر اختصاصی، هر برش به مدت ۵ دقیقه تحت تیمار با محلول بلوکه کننده‌ی پروتئین قرار گرفت. سپس، بلوک‌ها دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در TBS شستشو شدند. در مرحله‌ی بعد، آنتی‌بادی‌های اولیه‌ی

رابطه با سابقه‌ی خود فرد یا خانواده‌اش در ابتلا به سرطان کولون و سایر سرطان‌ها بود. از تمامی بیماران شرکت کننده در مصاحبه، رضایت‌نامه‌ی کتبی دریافت شد. اطلاعات ۴۰ بیمار از ۱۱۵۹ بیمار مورد مطالعه با معیارهای آمستردام II مطابقت داشت و در نهایت، ۲۰ بیماری که نمونه‌ی تومور و بافت طبیعی مجاور آن‌ها در دسترس بود، مورد بررسی‌های بعدی قرار گرفتند. این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد تأیید قرار گرفت.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA از ۴۰ بافت تثبیت شده با فرمالین و پارافینه شده (Formalin fixed paraffin embedded) بر طبق پروتکل انجام شد (۲۷). در ابتدا به منظور پارافین‌زدایی، دو برش $10 \mu\text{m}$ از هر بافت به همراه 1 ml گزین داخل یک تیوب Eppendorf تمیز با حجم $1/5 \mu\text{l}$ به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، تیوب‌ها با شتاب 13000 rpm و برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. آن‌گاه، ریه‌دراسیون بافت به ترتیب با استفاده از اتانول 100 ، 90 و 70 درصد انجام شد. پس از حذف الکل از بافت‌ها در کانستریتور SpeedVac و در دمای 45°C ، $400 \mu\text{l}$ از SDS (Sodium dodecyl sulfate) با غلظت ۱ درصد، $30 \mu\text{l}$ از پروتئیناز k با غلظت 20 mg/ml و 20 دانه از Chelex20 به هر کدام از میکروتیوب‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای 55°C در حمام آب گرم انکوبه شدند تا هضم آنزیمی صورت گیرد. سپس، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت آن‌ها در تیوب جدیدی گردآوری شد و با استفاده از روش فنل کلروفرم استخراج DNA به صورت دستی انجام گرفت.

واکنش Multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR) برای سیستم تشخیص ناپایداری میکروستالات Promega: کیت ارزیابی ناپایداری میکروستالات Promega از پنج نشانگر شبه مونو مورفیک (NR-21، BAT-26، BAT-25، NR-24 و MONO-27) به منظور تشخیص وضعیت میکروستالات تشکیل شده است. این کیت همچنین حاوی دو نشانگر پنج نوکلئوتیدی (Penta C و Penta D) به عنوان آشکارساز نمونه می‌باشد تا از اشتباه شدن احتمالی نمونه‌ها جلوگیری به عمل آورد. مراحل Multiplex PCR بر طبق دستورالعمل شرکت Promega به انجام رسید. سپس، نمونه‌های تکثیر شده در مرحله‌ی قبل توسط دستگاه ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer مورد بررسی قرار گرفت و پیک‌های ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار GeneMapper 3.7 (پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده) مورد تفسیر قرار گرفتند. هر گونه ناهمخوانی اندازه و شکل بین آلل طبیعی و آلل مبتلا به تومور، به عنوان ناپایداری میکروستالات در نظر گرفته شد و نمونه‌هایی با بیش از دو نشانگر ناپایدار از پنج نشانگر، در گروه نمونه‌های MSI-H قرار گرفتند.

پنل Promega. برای بررسی وضعیت میکروستلایت به نمونه‌ی مبتلا به تومور و همچنین به نمونه‌ی طبیعی مجاور آن احتیاج است. ۵ نشانگر تک نوکلئوتیدی کیت Promega و دو نشانگر پنج نوکلئوتیدی آن به روش Multiplex PCR ارزیابی شدند (شکل ۱). در میان ۲۰ نمونه‌ی مبتلا به تومور، ۸ نمونه (۴۰ درصد) ناپایداری بالایی را در نشانگرها نشان دادند و در گروه MSI-H قرار گرفتند و ۱۲ نمونه‌ی دیگر (۶۰ درصد) وضعیت ناپایداری اندک و یا پایداری کامل در نشانگرها را نشان دادند و در گروه MSI-L/MSS قرار گرفتند. در بین این نشانگرهای شبه مونو مورفیک، BAT26 با نشان دادن ناپایداری در هر ۸ تومور MSI-H به عنوان ناپایدارترین نشانگر شناخته شد (۴۰ درصد). هر دو نشانگر NR21 و NR24 در ۷ نمونه (۳۵ درصد) ناپایداری نشان دادند و BAT25 و MONO27 به ترتیب در ۶ نمونه (۳۰ درصد) و ۵ نمونه (۲۵ درصد) ناپایداری نشان دادند.

نتایج واکاوی نشانگر MT1XT20: محصولات نشان‌دار شده با فلورسنت حاصل از واکنش PCR این نشانگر، با استفاده از دستگاه Automated fragment analyzer مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر گونه تغییر در الگو با اندازه‌ی پیک‌های نمونه‌ی مبتلا به تومور نسبت به پیک‌های نمونه‌ی طبیعی مجاور آن، به عنوان ناپایداری میکروستلایت در نظر گرفته شد (شکل ۲). در این مطالعه، برای نشانگر MT1XT20، چهار نوع آلل با طول‌های ۱۸۵-۱۹۰ bp پیدا شد. در مقایسه با کیت Promega که به عنوان روش استاندارد طلایی در این آزمون تحت بررسی قرار گرفت، نشانگر MT1XT20 توانست ۵ نمونه از ۸ نمونه‌ی MS-H را به عنوان نمونه‌ی دارای ناپایداری میکروستلایت شناسایی کند و همه‌ی نمونه‌های MSS شناسایی شده توسط این کیت، با استفاده از این روش نیز وضعیتی مشابه نشان دادند.

نتایج آزمایش ایمنوهِستوشیمیایی: از میان ۲۰ خانواده که از طریق معیارهای آمستردام II انتخاب شدند، ۷ پروباند (۳۵ درصد) در حداقل یکی از پروتئین‌های مربوط به سیستم ترمیم ناجور جفت شدگی شان وضعیت عدم بیان نشان دادند و در گروه IHC-A یا IHC-absent طبقه‌بندی شدند. ۱۳ پروباند باقی مانده در هیچ یک از پروتئین‌های مسیر MMR نقضی نداشتند و در گروه IHC-P یا IHC-present group قرار گرفتند (شکل ۳). از میان ۷ نمونه‌ی IHC-A، ۴ نمونه (۷۵ درصد) برای هر دو پروتئین MLH1 و PMS2 وضعیت عدم رنگ پذیری نشان دادند و ۲ نمونه (۲۸/۵ درصد) نیز برای پروتئین‌های MSH2 و MSH6 چنین وضعیتی را نشان دادند. تنها ۱ نمونه از ۷ نمونه (۱۴ درصد) فقدان پروتئین MSH6 را نشان می‌داد.

محاسبه‌ی حساسیت، اختصاصیت و ارزش پیش‌بینی مثبت: در

رقیق شده شامل NCL-L-MSH2، NCL-L-MLH1، NCL-L-MSH6، NCL-L-PMS2 (ساخت شرکت Leica Biosystems) به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد و در دمای ۴ °C به مدت یک شب انکوبه شدند. آنتی‌بادی اولیه دو بار با استفاده از TBS شسته شد و حذف گردید. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه، در معرض واکنش‌گر Post primary block قرار گرفتند و دو بار دیگر با استفاده از TBS شستشو شدند. اسلایدها به مدت ۳۰ ثانیه در پلیمر Novolink انکوبه شدند و باز برای دو بار تحت شستشو با TBS قرار گرفتند و سپس، محلول DAB (3,3'-diaminobenzidine) به آن‌ها اضافه شد. این فرایند، با مراحل رنگ‌آمیزی کتراتست، دهیدراسیون نهایی و پاک‌سازی اسلایدها دنبال شد. ارزیابی اسلایدها توسط پاتولوژیستی خبره انجام گرفت و نمونه‌ها بر حسب وجود یا فقدان رنگ‌آمیزی هسته‌ای پروتئین‌های MMR، در دو گروه دارای نقص MMR (MMR-deficient) و فاقد نقص MMR (MMR-proficient) طبقه‌بندی شدند.

ارزیابی آماری: حساسیت (Sensitivity)، اختصاصیت (Specificity) و ارزش پیش‌بینی مثبت (Positive predictive values) پارامترهای مطالعه شده، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.

یافته‌ها

نوع سرطان، محل سرطان، سن و جنسیت فرد مبتلا: در خانواده‌های MSI-H و MMR-deficient فراوان‌ترین سرطان‌های مشاهده شده عبارت از سرطان‌های کولون، معده، روده‌ی کوچک، هماتوپوئیتیک، پروستات و پستان (جدول ۱).

در این خانواده‌ها بیشتر تومورها در مناطق کولون صعودی (Ascending colon) و کولون نزولی (Descending colon) ایجاد شده بودند (جدول ۲). در خانواده‌های MSS و IHC-proficient سرطان هماتوپوئیتیک با فراوانی کمتری مشاهده شد و در عوض، سرطان ریه نیز مشاهده گردید (جدول ۳).

بیشترین منطقه‌ی درگیر در ایجاد تومور در این گروه، سیگموئید (Sigmoid) و رکتوم (Rectum) بود (جدول ۴). سن متوسط بیماران MSI-H در زمان تشخیص تومور، ۳۸/۸ سال (بازه‌ی سنی ۳۱-۴۹) بود و سن متوسط بیماران MSS/MSI-L، ۴۶/۵ سال (بازه‌ی سنی ۲۴-۶۴) بود. بیشتر تومورهای MSI-H از نوع آدنومای کم تمایز یافته (Poorly differentiated adenocarcinoma) تا متوسط تمایز یافته (Moderately differentiated adenocarcinoma) بودند (جدول ۵). فراوان‌ترین تومورهای MSI-L/MSS در طبقه‌ی کاملاً تمایز یافته قرار گرفتند.

نشانگر، ۱۰۰ درصد بود. میزان حساسیت، اختصاصیت و ارزش پیش‌بینی مثبت روش ایمنوهِستوشیمیایی نیز محاسبه شد و به ترتیب برابر ۷۵ درصد، ۹۱/۶۷ درصد و ۸۵/۷۱ درصد بود.

مقایسه با کیت Promega به عنوان روش استاندارد طلائی، نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 حساسیتی معادل ۶۲/۵ درصد و اختصاصیتی معادل ۱۰۰ درصد نشان داد و ارزش پیش‌بینی مثبت این

جدول ۱. فراوانی نوع تومور در خانواده‌های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSI-H (Microsatellite instability high) و MMR-deficient (Mismatch repair-deficient)

خانواده‌های MSI-H فراوانی (درصد)	خانواده‌های MMR-deficient فراوانی (درصد)	نوع سرطان
۲۸ (۶۵/۵)	۲۷ (۶۴/۲)	سرطان کولون
۳ (۷/۰)	۲ (۴/۷)	سرطان روده‌ی کوچک
۳ (۷/۰)	۳ (۷/۱)	سرطان خون
۲ (۴/۶)	۴ (۹/۵)	سرطان معده
۲ (۴/۶)	۱ (۲/۳)	سرطان سینه
۲ (۴/۶)	۲ (۴/۷)	سرطان پروستات
۱ (۲/۳)	۱ (۲/۳)	سرطان ریه
۲ (۴/۶)	۲ (۴/۷)	سایر سرطان‌ها
۴۳ (۱۰۰)	۴۲ (۱۰۰)	جمع کل

MMR-deficient: Mismatch repair-deficient; MSI-H: Microsatellite instability high

جدول ۲. فراوانی منطقی تومور در خانواده‌های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSI-H (Microsatellite instability high) و MMR-deficient (Mismatch repair-deficient)

خانواده‌های MSI-H فراوانی (درصد)	خانواده‌های MMR-deficient فراوانی (درصد)	منطقی ایجاد تومور
۱ (۱۲/۵)	۱ (۱۴/۲)	سکوم
۲ (۲۵/۰)	۲ (۲۸/۵)	کولون صعودی
۱ (۱۲/۵)	۱ (۱۴/۲)	کولون عرضی
۲ (۲۵/۰)	۲ (۲۸/۵)	کولون نزولی
۱ (۱۲/۵)	۱ (۱۴/۲)	کولون سیگموئید
۱ (۱۲/۵)	۰ (۰)	رکتوم
۰ (۰)	۰ (۰)	نامشخص
۸ (۱۰۰)	۷ (۱۰۰)	جمع کل

MMR-deficient: Mismatch repair-deficient; MSI-H: Microsatellite instability high

جدول ۳. فراوانی نوع تومور در خانواده‌های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSS/MSI-L (Mismatch repair-proficient) MMR-proficient و (MSI stable/ Microsatellite instability low)

خانواده‌های MSS/MSI-L فراوانی (درصد)	خانواده‌های MMR-proficient فراوانی (درصد)	نوع سرطان
۲۲ (۳۳/۳)	۲۳ (۳۴/۳)	سرطان کولون
۳ (۴/۵)	۴ (۵/۹)	سرطان روده‌ی کوچک
۱ (۱/۵)	۱ (۱/۴)	سرطان خون
۱۰ (۱۵/۱)	۸ (۱۱/۹)	سرطان معده
۵ (۷/۵)	۶ (۸/۹)	سرطان سینه
۳ (۴/۵)	۳ (۴/۴۷)	سرطان پروستات
۶ (۹/۰)	۶ (۸/۹)	سرطان ریه
۱۶ (۲۴/۲)	۱۶ (۲۳/۸)	سایر سرطان‌ها
۶۶ (۱۰۰)	۶۷ (۱۰۰)	جمع کل

MMR-deficient: Mismatch repair-proficient; MSS/MSI-L: MSI stable/ Microsatellite instability low

جدول ۴. فراوانی منطقی بروز تومور در خانواده‌های ایرانی در معرض خطر سندرم Lynch در گروه‌های MSS/MSI-L و (Mismatch repair-proficient) MMR-proficient و (MSI stable/ Microsatellite instability low)

خانواده‌های MSS/MSI-L	خانواده‌های MMR-proficient	منطقه‌ی ایجاد تومور
فراوانی (درصد)	فراوانی (درصد)	
۱ (۸/۳)	۱ (۷/۶)	سکوم
۰ (۰)	۰ (۰)	کولون صعودی
۰ (۰)	۰ (۰)	کولون عرضی
۰ (۰)	۰ (۰)	کولون نزولی
۶ (۵۰/۰)	۶ (۴۶/۱)	کولون سیگنویید
۴ (۳۳/۳)	۵ (۳۸/۴)	رکتوم
۱ (۸/۳)	۱ (۷/۶)	نامشخص
۱۲ (۱۰۰)	۱۳ (۱۰۰)	جمع کل

MMR-deficient: Mismatch repair-proficient; MSS/MSI-L: MSI stable/ Microsatellite instability low

جدول ۵. فراوانی فنوتیپ تومور در خانواده‌های ایرانی مبتلا به سرطان کولون

خانواده‌های MSI-H	خانواده‌های MSI-L/MSS	درجه‌ی تومور
فراوانی (درصد)	فراوانی	
۲ (۲۵/۰)	۵ (۴۱/۶)	Well differentiated adenocarcinoma
۳ (۳۷/۵)	۳ (۲۵/۰)	Poorly differentiated adenocarcinoma
۳ (۳۷/۵)	۳ (۲۵/۰)	Moderately differentiated adenocarcinoma
۰ (۰)	۱ (۸/۳)	نامشخص
۸ (۱۰۰)	۱۲ (۱۰۰)	جمع کل

MSS/MSI-L: MSI stable/ Microsatellite instability low; MSI-H: Microsatellite instability high

موجود در روش ایمنوهیستوشیمیایی را بر طرف کرده است (۳۰).
بر خلاف روش ایمنوهیستوشیمیایی که به تعداد زیادی برش از نمونه احتیاج دارد، روش ارزیابی MSI بر پایه‌ی PCR استوار است و بنا بر این، با مقادیر اندکی از نمونه نیز قابل انجام می‌باشد. از طرف دیگر، روش MSI، در مقایسه با روش ایمنوهیستوشیمیایی به عنوان روشی غیر مستقیم شناخته شده و نمی‌تواند تعیین کند که کدام پروتئین مسیر MMR دچار نقصان شده است (۳۱).

برای بررسی وضعیت MSI، پنل‌های چند نشانگری متعددی ارایه شده است (۲۰)، اما تلاش برای ارایه‌ی نشانگرهای تک نوکلئوتیدی جایگزین، با حساسیت و اختصاصیتی مشابه با این پنل‌ها ادامه دارد تا بتوان وضعیت MSI را در زمان کوتاه‌تر و هزینه‌ی کمتر مورد بررسی قرار داد (۳۳-۳۲، ۲۵، ۱۰). در برخی از مطالعات، نشانگر CAT25 حساسیت و اختصاصیت بالایی را در مقایسه با پنل‌های چند نشانگری نشان داد (۲۵-۲۴). استفاده از نشانگر CAT25 به تنهایی یا همراه با نشانگر BAT26 به عنوان پنلی ساده برای بررسی وضعیت MSI پیشنهاد شده است (۲۴، ۱۰). در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به سرطان کولون ایرانی صورت گرفت، میزان دقت پنچ نشانگر مونو مورفیک NR-21، NR-27،

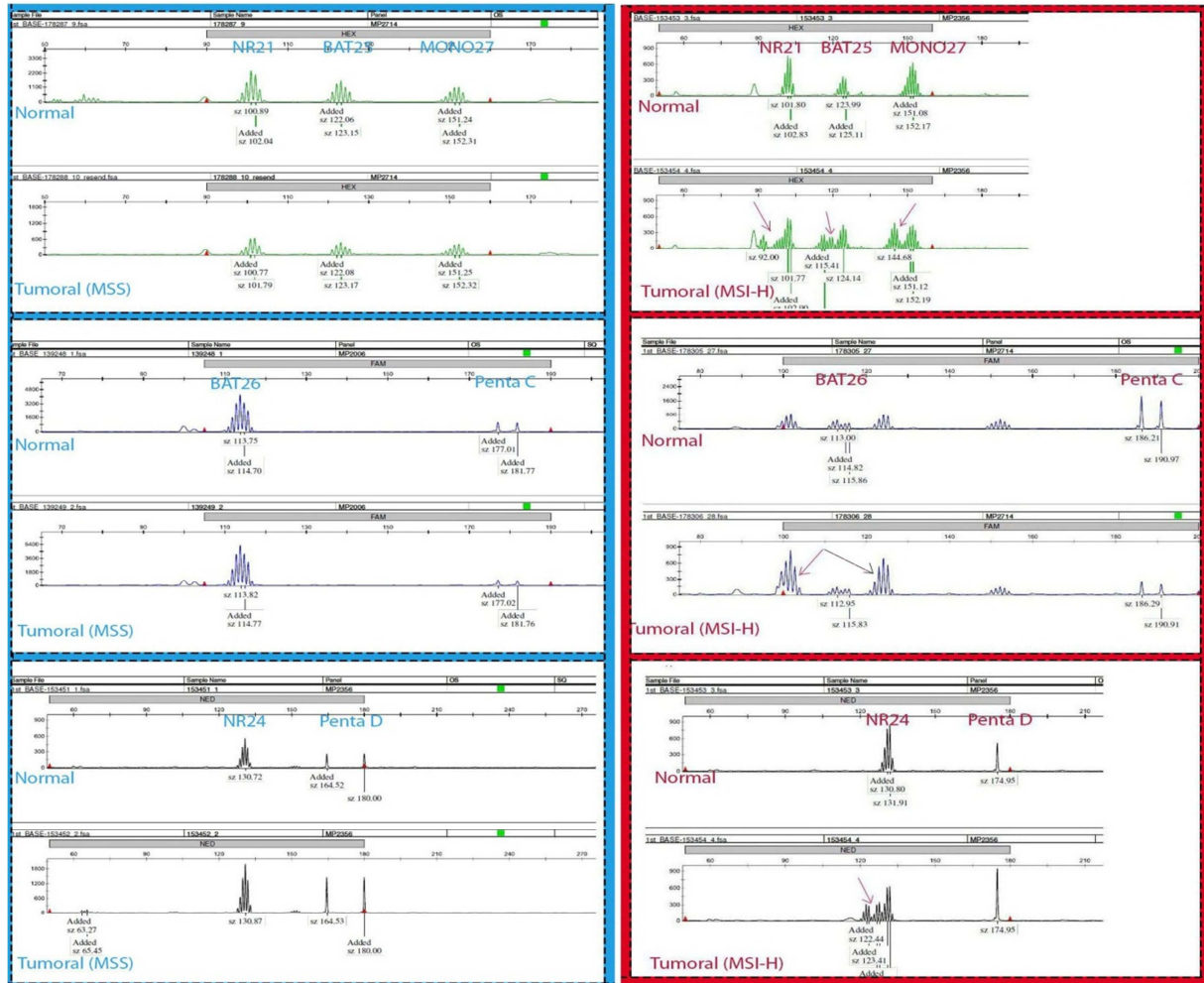
بحث

به طور سالانه، ۶-۷/۹ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در کشور ایران به سرطان کولون مبتلا می‌گردند که حدود ۴/۹ درصد آن‌ها به عنوان فرد مبتلا به سندرم Lynch شناسایی می‌شوند (۲۸). در حدود ۷۰-۹۰ درصد بیماران مبتلا به سندرم Lynch، وضعیت ناپایداری میکروستلایت را نشان می‌دهند (۲۹). سندرم Lynch، نوعی از سندرم سرطان است و به دلیل جهش در ژن‌های دخیل در مسیر ترمیمی ناجور جفت شدگی رخ می‌دهد. مهم‌ترین این ژن‌ها عبارت از MSH6، MSH2، MLH1 و PMS2 هستند.

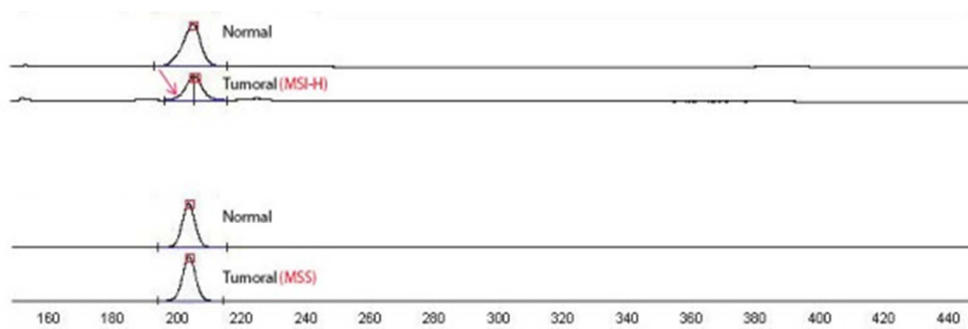
در حال حاضر، استفاده‌ی هم‌زمان از آنالیز ناپایداری میکروستلایت و آزمایش ایمنوهیستوشیمیایی، روشی موثق و با حساسیت بالا برای غربال‌گری بیماران مبتلا به سندرم Lynch می‌باشد. استفاده از روش ایمنوهیستوشیمیایی به تنهایی قادر به تشخیص بیماران مبتلا به Lynch با جهش‌های تغییر چارچوب، جایگاه پیرایش و بازآرایی‌های بزرگ ژنومی نمی‌باشد؛ چرا که در این نوع جهش‌ها، پروتئین تولید می‌شود، اما از کارایی کافی برخوردار نیست (۱۳، ۱۵). روش جایگزین یعنی آنالیز ناپایداری میکروستلایت، که امروزه به عنوان روشی لازم‌الاجرا شناخته می‌شود، این نقص

سایر پژوهشگران مورد سؤال قرار گرفته است (۳۵) و در عوض، نشانگر BAT26 به عنوان معتبرترین نشانگر برای ارزیابی وضعیت MSI معرفی شده است (۳۶، ۲۱).

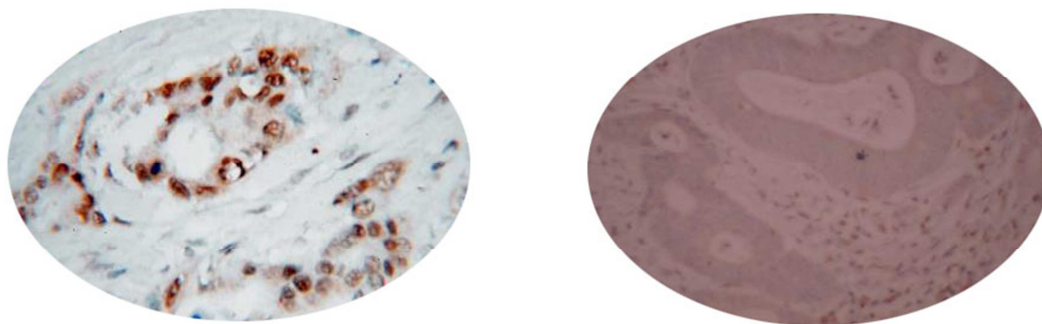
ارزیابی شد و از میان آن‌ها، دو نشانگر BAT25 و NR-21 به عنوان حساس‌ترین نشانگرها معرفی شدند (۳۴). این در حالی است که کارایی نشانگر BAT25 توسط



شکل ۱. الکتروفروگرام DNA سیستم ارزیابی ناپایداری میکروساتلایت Promega (نرم افزار GeneMapper v3.7) وضعیت پایدار میکروساتلایت را در بافت مبتلا به تومور و بافت طبیعی مجاور آن در سمت چپ و وضعیت ناپایدار میکروساتلایت را در بافت مبتلا به تومور و بافت طبیعی مجاور آن در سمت راست نشان می‌دهد.



شکل ۲. نمونه‌ای از تغییر وضعیت آللی MT1XT20 در یک نمونه‌ی MSI-H (Microsatellite instability high)



شکل ۳. رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمیایی بافت MMR-deficient (Mismatch repair-deficient) (در سمت راست) و بافت MMR-proficient (Mismatch repair-proficient) (در سمت چپ) که با استفاده از آنتی بادی MSH2 صورت گرفته است (تحت لنز ۴۰× میکروسکوپ)

بیان را تنها در یک پروتئین سیستم MMR (MSH6) نشان داد که می توان کم بودن تعداد بیماران دارای نقص در MSH6 را با پدیده‌ی Functional redundancy پروتئین‌های MSH3 و MSH6 توجیه کرد (۲). در مجموع و با توجه به نتایج به دست آمده از هر سه روش سنجش بیماران مشکوک به HNPCC، به نظر می‌رسد استفاده از کیت پنج نشانگری Promega، بایستی در اولویت قرار گیرد؛ چرا که از دقت عملکرد بالاتری نسبت به دو روش IHC و سنجش تک نشانگری برخوردار است.

همچنین، در این مطالعه از میان نشانگرهای تک نوکلئوتیدی موجود در پنل Promega، نشانگر BAT26 به عنوان ناپایدارترین نشانگر شناخته شد؛ چرا که، در ۱۰۰ درصد بیماران MSI-H وضعیت ناپایداری را نشان داد. این در حالی است که نشانگر MONO27 با نشان دادن وضعیت ناپایداری در ۵ نمونه از ۸ نمونه‌ی MSI-H، به عنوان پایدارترین نشانگر شناخته شد. نتایج متناقضی در مطالعات مشابه ایرانی به دست آمده است: یک گروه از پژوهشگران ایرانی با مطالعه بر روی ۸۰ نمونه از بیماران مبتلا به سرطان کولون اسپورادیک، نشانگرهای NR-21 و NR-24 را با ۴۵ درصد ناپایداری به عنوان ناپایدارترین نشانگرها معرفی کردند (۳۷) و گروه دیگر با مطالعه بر روی بیماران مبتلا به سندرم Lynch و سرطان کولون اسپورادیک، نشانگر NR-21 را به عنوان ناپایدارترین نشانگر در هر دو گروه بیماران، به ترتیب با ناپایداری در ۲۵/۶ درصد و ۵۳ درصد معرفی کردند (۳۸). دلیل تفاوت در نتایج به دست آمده در هر کدام از نشانگرهای پنل Promega، می‌تواند توضیح دهنده‌ی این مسأله باشد که تمام میکروستلایتهای ژنوم، طی پدیده‌ی نقص در سیستم ترمیم ناجور جفت شدگی، به یک اندازه دستخوش تغییر نمی‌شوند. با این حال، بالا بودن دقت و اعتبار نشانگر BAT26 در مطالعات قبلی و در ژنوم جمعیت‌های مختلف جهان به اثبات رسیده بود (۲۱، ۳۶) و در این مطالعه نیز به اثبات رسید. بنا بر این، می‌توان به این نتیجه

در سال‌های اخیر، Morandi و همکاران، وضعیت MSI را در ۳۴۰ بیمار مبتلا به سرطان کولون از طریق سه واکنش Multiplex PCR با استفاده از ۱۶ نشانگر بررسی کردند. این نشانگرهای شبه مونومرفیک عبارت از BAT26، BAT25، NR24، NR21، MT1XT20، BAT40، MybT22، TGFB2، CSF1PO، D18S58، D17S250، D5S346، D2S123، CAT25، MT1XT20 و D7S820 بودند. از میان این نشانگرها، BAT26 حساسیت بالایی را (۹۷/۳ درصد) در مقایسه با نشانگرهای BAT26 (۹۷/۵ درصد) و CAT25 (۹۷/۱ درصد) نشان داد (۲۶). با توجه به وجود نتایج متناقض برخی از مطالعات در رابطه با نشانگر BAT26، در این مطالعه هر دو روش معتبر فعلی غربالگری بیماران مبتلا به سندرم Lynch یعنی MSI (شامل نشانگرهای BAT26، NR24، NR21، BAT25 و MONO 27) و ایمنو هیستوشیمی به همراه روش تک نوکلئوتیدی MT1XT20 مورد سنجش قرار گرفت. با به کارگیری پنل پنج نشانگری Promega، ۸ بیمار (۴۰ درصد) از ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان کولون که اطلاعات آن‌ها با معیارهای آمستردام II مطابقت داشت، به عنوان MSI-H شناسایی شدند. این در حالی است که با استفاده از روش ارزیابی تک نوکلئوتیدی، تنها ۵ بیمار وضعیت ناپایداری در توالی میکروستلایت را نشان دادند (۲۵ درصد). عدم تطابق نتایج سنجش وضعیت میکروستلایت با استفاده از نشانگر تک نوکلئوتیدی MT1XT20 در مطالعه‌ی جمعیت ایتالیایی و مطالعه‌ی حاضر، بر تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت ایرانی و ایتالیایی دلالت دارد.

علاوه بر این، با استفاده از روش سنجش ایمنو هیستوشیمیایی، ۷ نمونه (۳۵ درصد) وضعیت فقدان پروتئین‌های MMR را نشان دادند. ۴ نمونه از این ۷ نمونه دچار نقص در هر دو پروتئین MLH1/PMS2 بودند و ۲ نمونه نیز دارای نقص در پروتئین‌های MSH2/MSH6 بودند. تنها یک نمونه از این ۷ نمونه، وضعیت عدم

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد نجمه فراهانی به شماره‌ی ۴۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد و هزینه‌های اجرای آن توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تامین گردیده است.

رسید که BAT26 نشانگری بسیار قابل اعتماد برای تشخیص وضعیت MSI است و می‌تواند چه به صورت تکی و چه به صورت جزئی از پنل‌های تشخیصی، برای روشن ساختن وضعیت MSI بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به کار رود.

References

- Lynch HT, Boland CR, Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(4): 390-402.
- Zeinalian M, Emami MH, Salehi R, Naimi A, Kazemi M, Hashemzadeh-Chaleshtori M. Molecular analysis of Iranian colorectal cancer patients at risk for Lynch syndrome: a new molecular, clinicopathological feature. *J Gastrointest Cancer* 2015; 46(2): 118-25.
- Boland CR. The mystery of mismatch repair deficiency: lynch or lynch-like? *Gastroenterology* 2013; 144(5): 868-70.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429): 558-61.
- Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996; 56(21): 4836-40.
- Chaksangchaichot P, Punyarit P, Petmitr S. Novel hMSH2, hMSH6 and hMLH1 gene mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(1): 65-70.
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(16): 6463-71.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(10): 919-32.
- Fukutomi Y, Moriwaki H, Nagase S, Tajika M, Naito T, Miwa Y, et al. Metachronous colon tumors: risk factors and rationale for the surveillance colonoscopy after initial polypectomy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128(10): 569-74.
- Deschoolmeester V, Baay M, Wuyts W, Van Marck E, Van Damme N, Vermeulen P, et al. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. *J Mol Diagn* 2008; 10(2): 154-9.
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(3): 247-57.
- Rodriguez-Bigas MA, Moeslein G. Surgical treatment of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome). *Fam Cancer* 2013; 12(2): 295-300.
- Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293-300.
- Ward R, Meldrum C, Williams R, Mokany E, Scott R, Turner J, et al. Impact of microsatellite testing and mismatch repair protein expression on the clinical interpretation of genetic testing in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128(8): 403-11.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5248-57.
- Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, Nassif NA, Burgart LJ, Halberg RB, et al. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers* 2004; 20(4-5): 237-50.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261-8.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453-6.
- Patil DT, Bronner MP, Portier BP, Fraser CR, Plesec TP, Liu X. A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA. *Diagn Mol Pathol* 2012; 21(3): 127-33.
- Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006; 24(2): 241-51.
- Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Pinol V, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(3): 244-52.
- de la Chapelle A. Microsatellite instability phenotype of tumors: genotyping or immunohistochemistry? The jury is still out. *J Clin Oncol* 2002; 20(4): 897-9.
- Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R,

- Bork P, et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 93(1): 12-9.
24. Findeisen P, Kloor M, Merx S, Sutter C, Woerner SM, Dostmann N, et al. T25 repeat in the 3' untranslated region of the CASP2 gene: a sensitive and specific marker for microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 2005; 65(18): 8072-8.
 25. Bianchi F, Galizia E, Catalani R, Belvederesi L, Ferretti C, Corradini F, et al. CAT25 is a mononucleotide marker to identify HNPCC patients. *J Mol Diagn* 2009; 11(3): 248-52.
 26. Morandi L, de Biase D, Visani M, Monzoni A, Tosi A, Brulatti M, et al. T([20]) repeat in the 3'-untranslated region of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27(5): 647-56.
 27. Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp* 2011; (49).
 28. Nemati A, Rahmatabadi ZK, Fatemi A, Emami MH. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and familial colorectal cancer in Central part of Iran, Isfahan. *J Res Med Sci* 2012; 17(1): 67-73.
 29. Fishel R. Signaling mismatch repair in cancer. *Nat Med* 1999; 5(11): 1239-41.
 30. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2073-87.
 31. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20(4): 1043-8.
 32. Bouzourene H, Taminelli L, Chaubert P, Monnerat C, Seelentag W, Sandmeier D, et al. A cost-effective algorithm for hereditary nonpolyposis colorectal cancer detection. *Am J Clin Pathol* 2006; 125(6): 823-31.
 33. Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumors and predict tumor content: implications for population screening. *Int J Cancer* 2005; 113(3): 446-50.
 34. Haghghi MM, Javadi GR, Parivar K, Milanizadeh S, Zali N, Fatemi SR, et al. Frequent MSI mononucleotide markers for diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(4): 1033-5.
 35. Ichikawa A, Sugano K, Fujita S. DNA variants of BAT-25 in Japanese, a locus frequently used for analysis of microsatellite instability. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31(7): 346-8.
 36. Esemuede I, Forslund A, Khan SA, Qin LX, Gimbel MI, Nash GM, et al. Improved testing for microsatellite instability in colorectal cancer using a simplified 3-marker assay. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(12): 3370-8.
 37. Esmailnia G, Montazer-Haghghi M, Javadi Gh, Parivar K, Zali M. Microsatellite instability markers status in colorectal cancer. *Zahedan J Res Med Sci* 2014; 16(2): 25-8.
 38. Shemirani AI, Haghghi MM, Zadeh SM, Fatemi SR, Taleghani MY, Zali N, et al. Simplified MSI marker panel for diagnosis of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12(8): 2101-4.

MT1XT20 Single Quasi-Monomorphic Mononucleotide Marker for Detection of Microsatellite Instability in Iranian Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)

Najmeh Farahani¹, Parvaneh Nikpour PhD², Mohammad Hassan Emami MD³,
Morteza Hashemzadeh PhD⁴, Mehrdad Zeinalian MSc⁵, Rasoul Salehi PhD⁶

Original Article

Abstract

Background: Colorectal malignancies with high microsatellite instability (MSI-H), either hereditary or sporadic, demonstrate better prognosis, altered response to fluorouracil (5FU) chemotherapy and altered operative approach. It is now recommended to perform MSI testing for all new cases of colorectal cancers regardless of being categorized as hereditary or sporadic. This study aimed to evaluate MT1XT20 mononucleotide marker in Iranian patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). The samples were further characterized using Promega five-marker MSI testing panel and immunohistochemical (IHC) technique.

Methods: MT1XT20 mononucleotide marker and commercially available kit (Promega, USA) incorporating five quasi-monomorphic markers were studied in 20 cases of HNPCC using polymerase chain reaction (PCR) technique. IHC was performed to evaluate the status of all four important mismatch repair (MMR) proteins, too.

Findings: Eight (40%), seven (35%) and five (25%) cases showed MSI using Promega kit, IHC and MT1XT20, respectively. Among the markers included in Promega kit, BAT26 marker with instability in all 8 samples (100%) was the most instable marker. NR24 and NR21 markers showed instability in 7 cases (87.5%); BAT25 and MONO 27 markers were instable in 6 (75.0%) and 5 (62.5%) specimens, respectively.

Conclusion: Although MT1XT20 is considered as a valid single marker in Italian population, it seems this is not hold true about the Iranian patients. Instead, BAT26 among the markers included in Promega MSI testing was shown instability in all 8 samples of MSI-H colorectal cancer (CRC). Therefore, it may be concluded that BAT26 alone is as efficient as the cohort of five markers in Iranian patients.

Keywords: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), Microsatellite instability (MSI), MT1XT20, Quasi-monomorphic repeats

Citation: Farahani N, Nikpour P, Emami MH, Hashemzadeh M, Zeinalian M, Salehi R. **MT1XT20 Single Quasi-Monomorphic Mononucleotide Marker for Detection of Microsatellite Instability in Iranian Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC).** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2120-30

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

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

3- Associate Professor, Poursina Hakim Gastrointestinal Research Center, Poursina Hakim Research Institution AND Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

5- PhD Student, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

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

Corresponding Author: Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

بررسی تأثیر بیهوشی عمومی بر زمان پر شدگی مویرگی در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد

دکتر محمد گل‌پرور^۱، دکتر سعید عباسی^۱، رویا کثیری^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: زمان پر شدگی مویرگی به صورت گسترده به عنوان یک روش سریع برای ارزیابی سیستم قلبی-عروقی و تعیین وضعیت گردش خون و توزیع محیطی خون در بیماران به کار می‌رود. از سوی دیگر، Cardiac heart failure سندرم کلینیکی پیچیده‌ای است که به علت کارکرد نامناسب بطنی ایجاد می‌شود و به دنبال آن، هیپرتروفی و اتساع بطنی اتفاق می‌افتد و کاهش عملکرد قلبی، زمان پر شدگی مویرگی را افزایش می‌دهد؛ اما نتایج به دست آمده در این زمینه، ناهمگون و گاهی متناقض است. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر انجام بیهوشی عمومی بر زمان پر شدگی مویرگی در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد انجام شد.

روش‌ها: طی یک مطالعه‌ی هم‌گروهی آینده‌نگر، ۵۰ بیمار مبتلا به نارسایی احتقانی قلب (گروه مورد) و ۵۰ فرد غیر مبتلا به بیماری قلبی-عروقی (گروه شاهد) که کاندیدای عمل جراحی انتخابی بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر دو گروه، مدت زمان پر شدگی مویرگی و پارامترهای همودینامیک در قبل از القای بیهوشی و ۳۰ دقیقه پس از القای بیهوشی اندازه‌گیری و مقایسه گردید.

یافته‌ها: میانگین زمان پر شدگی مویرگی در قبل از القای بیهوشی در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب $0/21 \pm 0/94$ و $0/18 \pm 0/76$ دقیقه و در گروه مورد، به طور معنی‌داری بیشتر بود. این میانگین در دقیقه‌ی ۳۰ بعد از القای بیهوشی در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب $0/18 \pm 0/90$ و $0/17 \pm 0/81$ دقیقه و تفاوت دو گروه معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در قبل از القای بیهوشی، پارامترهای همودینامیک در دو گروه اختلاف معنی‌دار داشت، اما در ۳۰ دقیقه‌ی بعد از عمل، فشار خون سیستول و ضربان قلب در دو گروه متفاوت نبود و تنها فشار خون دیاستول اختلاف معنی‌داری بین دو گروه نشان داد.

نتیجه‌گیری: بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب از نظر پارامترهای همودینامیک با افراد غیر مبتلا، متفاوت هستند و لازم است در طی مدت عمل، تیم بیهوشی به وضعیت همودینامیک این بیماران توجه خاص داشته باشند. ضمن این که زمان پر شدگی مویرگی در این قبیل بیماران، طولانی‌تر از افراد عادی است. بنا بر این، می‌توان در مراقبت‌ها و معاینات قبل از عمل، از این پارامتر نیز به عنوان یک شاخص تعیین‌کننده در احتمال وجود نارسایی قلبی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: زمان پر شدگی مویرگی، نارسایی احتقانی قلب، بیهوشی

ارجاع: گل‌پرور محمد، عباسی سعید، کثیری رویا. بررسی تأثیر بیهوشی عمومی بر زمان پر شدگی مویرگی در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۲): ۲۱۳۶-۲۱۳۱

مقدمه

اندازه‌گیری CRT از طریق دیدن و بررسی مدت زمان نیاز برای بازگشت خون به عروق انتهایی (Distal) پس از تخلیه‌ی عروق با اعمال فشار توسط معاینه‌کننده است. از این معیار، برای کنترل و نظارت بر دهیدراسیون و بررسی توزیع محیطی خون استفاده می‌شود و مدت زمان طبیعی آن کمتر از ۲ است که در افراد و شرایط مختلف، متفاوت می‌باشد (۱).

CHF (Congestive heart failure) سندرم کلینیکی پیچیده‌ای

زمان پر شدگی مویرگی (CRT یا Capillary refill time) به صورت گسترده توسط پزشکان و مراقبان سلامتی به عنوان یک روش سریع و سازمان یافته برای ارزیابی سیستم قلبی-عروقی و تعیین وضعیت گردش خون در بیماران به کار می‌رود. این‌طور فرض می‌شود که CRT یک معیار ساده و جایگزین برای بررسی توزیع محیطی خون است (۱).

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات بیهوشی و مراقبت‌های ویژه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

نویسنده‌ی مسؤول: رویا کثیری

Email: k1988@yahoo.com

و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد، توان آزمون ۸۰ درصد، انحراف معیار زمان پر شدگی مویرگی معادل ۰/۹ و حداقل تفاوت معنی دار بین دو گروه که معادل ۰/۵، حجم نمونه‌ی مورد نیاز مطالعه به تعداد ۵۰ بیمار در هر گروه برآورد شد.

روش کار بدین صورت بود که بعد از تصویب پیش‌نویس طرح تحقیقاتی، بیماران مراجعه کننده به مرکز پزشکی الزهرای (س) اصفهان، قبل از اعزام به اتاق عمل، ویزیت شدند و در صورتی که بر اساس اکوی قلب، CHF در آن‌ها قطعی بود، به عنوان گروه مورد در صورت عدم وجود علائم CHF به عنوان شاهد وارد مطالعه شدند.

پس از قرار گرفتن بیمار روی تخت عمل، علائم حیاتی شامل SPO_2 (Oxygen Saturation)، ضربان قلب، فشار خون و درجه‌ی حرارت بدن آن‌ها اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید و در صورتی که به طور ملموس انتهای اندام فوقانی بیمار سرد بود، بیمار وارد مطالعه نمی‌شد. سپس دست بیمار، بالاتر از سطح قلب نگاه داشته و با دست بر روی بستر ناخن بیمار (یکی از ناخن‌های دست یا پا) فشار اعمال می‌شد تا زمانی که به سفیدی بگراید، که نشانه‌ی خروج خون از عروق بافتی است. سپس، فشار برداشته شد و مدت زمان بازگشت خون بافتی که با صورتی شدن رنگ ناخن مشخص می‌شد، اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید.

القای بیهوشی در تمامی بیماران یکسان و طبق شرایط استاندارد با فتانیل، آترا کوریوم و اتومیدیت انجام شد و نگهداری بیهوشی با پروپوفول، N_2O (Nitrous oxide) ۵۰ درصد در اکسیژن انجام گرفت. نیم ساعت پس از انجام بیهوشی عمومی، بار دیگر به روش قبل، CRT اندازه‌گیری و ثبت شد. همچنین در زمان اندازه‌گیری CRT، علائم حیاتی شامل ضربان قلب، فشار خون، SPO_2 ، $EtCO_2$ (End-tidal carbon dioxide) و BIS (Bispectral index) نیز اندازه‌گیری و در فرم جمع‌آوری اطلاعات هر بیمار ثبت گردید.

داده‌های به دست آمده در نهایت با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ (version 23, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آماری χ^2 و t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۰۰ بیمار تحت اعمال جراحی مختلف که ۵۰ نفر آن‌ها دچار نارسایی قلبی و ۵۰ نفر آن‌ها فاقد بیماری قلبی بودند، وارد مطالعه شدند. میانگین سن دو گروه مورد و شاهد به ترتیب $53/6 \pm 11/9$ و $53/6 \pm 14/2$ سال بود و طبق آزمون t، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت ($P = 0/990$). در این دو گروه، به ترتیب ۲۶ و ۲۳ نفر مرد (۵۲ در مقابل ۴۶ درصد) و سایر بیماران زن بودند و آزمون χ^2 اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد ($P = 0/550$). شایع‌ترین

است که به علت کارکرد نامناسب بطنی (به صورت حاد و مزمن) ایجاد می‌شود و در شرایطی که بازگشت وریدی قلب طبیعی است، اما قلب توانایی پمپاژ خون کافی برای نیازهای متابولیکی بدن، تحت فشار پر شدگی طبیعی را ندارد، ایجاد می‌شود و در ادامه، این روند به علت کافی نبودن قدرت انقباضی میوکارد، به صورت جبرانی هیپرتروفی و اتساع بطنی اتفاق می‌افتد (۲). از علائم CHF مرتبط با موضوع مورد بررسی، می‌توان به کاهش پالس‌های محیطی و CRT بیشتر از ۳ ثانیه اشاره کرد (۲). در سال‌های اخیر، در مطالعات متعدد، ارزشمندی این یافته مورد توجه مجدد قرار گرفته است.

Lobos و همکاران با انجام مطالعه‌ای بر روی ۵۸ کودک دچار نقص مادرزادی قلب، چنین نتیجه‌گیری نمودند که CRT در بیماران تحت بیهوشی عمومی با برون‌ده قلب تطابق ندارد (۳). در مطالعه‌ی دیگری، Anderson و همکاران دریافتند که با توجه به تأثیر شرایط محیطی و عوامل فردی، قابلیت اعتماد CRT زیر سؤال می‌باشد (۴). با این وجود، Raimer و همکاران با انجام یک مطالعه‌ی آینده‌نگر دو ساله بر روی اطفال، چنین نشان دادند که CRT کمتر یا مساوی ۲ ثانیه، به طور قابل اعتمادی بیان‌گر $SCVO_2$ (Central venous oxygen saturation) بیشتر از ۷۰ درصد می‌باشد (۵) و حتی Evans و همکاران از CRT به عنوان معیاری جهت ارزیابی شدت بیماری مالاریا نام برده است (۶).

با توجه به نتایج ناهمگون مطالعات پیش‌گفته و همچنین مطالعات جدید دیگر انجام شده در این زمینه که طیف وسیعی از نتایج را داشته است، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر انجام بیهوشی عمومی بر CRT در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلبی به انجام رسید.

روش‌ها

این پژوهش، یک مطالعه‌ی هم‌گروهی آینده‌نگر بود که در سال ۱۳۹۴ در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان انجام گرفت. جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران کاندیدای عمل جراحی انتخابی بود. افراد مبتلا به نارسایی قلبی، گروه مورد و افراد غیر مبتلا به نارسایی قلبی، گروه شاهد را تشکیل دادند.

معیارهای ورود به مطالعه شامل ابتلا به CHF (برای گروه مورد)، تمایل به کاندیدای عمل جراحی انتخابی تحت بیهوشی عمومی، عدم وجود موارد محدودیت مصرف آتراکوریوم و اتومیدیت و موافقت بیمار برای شرکت در مطالعه بود. همچنین، مقرر گردید در صورت افت شدید فشار خون سیستول (بیش از ۳۰ درصد) در ۳۰ دقیقه‌ی اول پس از القای بیهوشی عمومی، بروز خونریزی قابل ملاحظه و بروز هیپوترمی حین عمل، بیمار از مطالعه خارج گردد. با استفاده از فرمول برآورد حجم نمونه جهت مقایسه‌ی دو میانگین

بیهوشی، در گروه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود. میانگین‌ها در هر دو زمان دقیقه‌ی ۳۰ و دقیقه‌ی ۶۰ در دو گروه اختلاف معنی‌دار داشت و در گروه مورد بالاتر بود.

میانگین زمان پر شدگی مویرگی در قبل از القای بیهوشی در گروه مورد $0/21 \pm 0/94$ و در گروه شاهد $0/18 \pm 0/76$ دقیقه بود؛ میانگین زمان پر شدگی مویرگی در گروه مورد به طور معنی‌داری بیشتر بود. این میانگین، در دقیقه‌ی ۳۰ بعد از القای بیهوشی در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب $0/18 \pm 0/90$ و $0/17 \pm 0/81$ دقیقه و تفاوت دو گروه معنی‌دار بود ($P < 0/001$).

با انجام آزمون t زوجی در گروه مورد (مبتلا به نارسایی احتقانی قلب) به منظور ارزیابی میزان تغییر در سرعت پر شدگی مویرگی حین بیهوشی عمومی نسبت به قبل از بیهوشی، $P = 0/015$ به دست آمد که بیان گر کاهش معنی‌دار زمان پر شدگی مویرگی حین بیهوشی نسبت به قبل از بیهوشی در بیماران مبتلا به CHF می‌باشد.

در شکل ۱، توزیع زمان پر شدگی مویرگی در دو گروه مورد مطالعه آمده است.

میانگین شاخص $ETCO_2$ در دقیقه‌ی ۳۰ در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب $3/16 \pm 3/94$ و $1/87 \pm 3/28$ و اختلاف دو

نوع عمل در هر دو گروه، اعمال جراحی شکم با فراوانی ۲۵ مورد در گروه مورد و ۲۱ مورد در گروه شاهد بود (۵۰ در مقابل ۴۲ درصد) و اختلاف معنی‌دار بین دو گروه مشاهده نشد ($P = 0/140$). در جدول ۱، توزیع متغیرهای دموگرافیک دو گروه آمده است.

در جدول ۲، میانگین و انحراف معیار پارامترهای همودینامیک بیماران در قبل از القای بیهوشی و ۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی به تفکیک دو گروه مورد و شاهد آمده است. بر حسب آزمون t، میانگین ضربان قلب در قبل از القای بیهوشی در گروه مورد، به طور معنی‌داری بیشتر بود، اما در دقیقه‌ی ۳۰ بعد از القای بیهوشی، تفاوت معنی‌دار بین دو گروه وجود نداشت.

میانگین فشار سیستول نیز قبل از القای بیهوشی در گروه مورد به طور معنی‌داری بیشتر بود، اما در دقیقه‌ی ۳۰ بعد از القای بیهوشی، اختلاف معنی‌دار بین دو گروه وجود نداشت. در عین حال، میانگین فشار خون دیاستول در دقایق ۳۰ و ۶۰ بین دو گروه اختلاف معنی‌دار داشت. میانگین فشار متوسط شریانی در قبل از القای بیهوشی در گروه مورد، به طور معنی‌داری کمتر بود، اما در دقیقه‌ی ۳۰ بعد از القای بیهوشی، بین دو گروه متفاوت نبود.

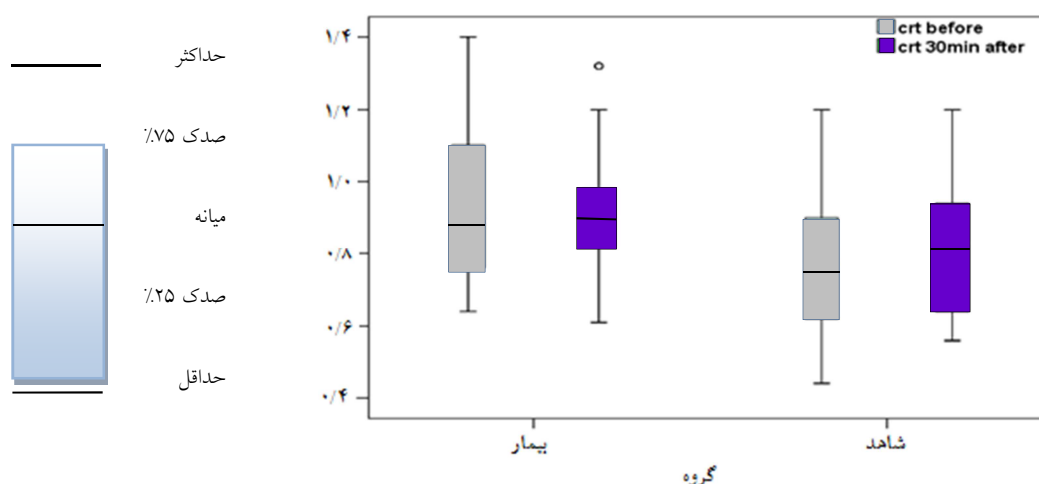
میانگین درجه‌ی حرارت بدن و SPO_2 در قبل و بعد از القای

جدول ۱. توزیع متغیرهای دموگرافیک دو گروه مورد و شاهد

مقدار P	غیر مبتلا به نارسایی احتقانی قلب	مبتلا به نارسایی احتقانی قلب	گروه	متغیر
0/990	$53/6 \pm 14/2$	$53/6 \pm 11/9$		سن (سال) میانگین \pm انحراف معیار
0/550	۲۳ (۴۶)	۲۶ (۵۲)	مرد	جنس [تعداد (درصد)]
	۲۷ (۵۴)	۲۴ (۴۸)	زن	
0/140	۱۲ (۲۴)	۱۶ (۳۲)	اندام	نوع عمل [تعداد (درصد)]
	۲۱ (۴۲)	۲۵ (۵۰)	شکم	
	۶ (۱۲)	۶ (۱۲)	قفسه‌ی سینه	
	۱۱ (۲۲)	۳ (۶)	سر و گردن	

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار پارامترهای همودینامیک در دو گروه مورد و شاهد

مقدار P	غیر مبتلا به نارسایی احتقانی قلب	مبتلا به نارسایی احتقانی قلب	زمان	پارامتر
0/008	$86/5 \pm 12/6$	$93/5 \pm 13/0$	قبل از القای بیهوشی	ضربان قلب (تعداد در دقیقه)
0/660	$88/9 \pm 17/0$	$87/6 \pm 12/9$	۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی	
< 0/001	$129/8 \pm 11/7$	$145/6 \pm 28/2$	قبل از القای بیهوشی	فشار سیستول (mmHg)
0/880	$126/0 \pm 13/7$	$125/5 \pm 18/0$	۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی	
0/014	$84/9 \pm 8/5$	$92/2 \pm 19/0$	قبل از القای بیهوشی	فشار دیاستول (mmHg)
0/009	$84/1 \pm 12/7$	$77/1 \pm 13/7$	۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی	
0/003	$98/2 \pm 9/2$	$108/6 \pm 22/7$	قبل از القای بیهوشی	فشار متوسط (mmHg)
0/160	$96/8 \pm 12/5$	$93/1 \pm 13/4$	۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی	
< 0/001	$36/4 \pm 0/3$	$35/4 \pm 0/2$	قبل از القای بیهوشی	درجه‌ی حرارت مرکزی ($^{\circ}C$)
< 0/001	$36/4 \pm 0/3$	$35/7 \pm 0/3$	۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی	
0/015	$94/1 \pm 3/3$	$92/5 \pm 3/2$	قبل از القای بیهوشی	SPO_2 (Oxygen saturation)
< 0/001	$99/4 \pm 1/3$	$97/3 \pm 2/4$	۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی	(درصد)



شکل ۱. میانه، دامنه و صدک ۲۵ و ۷۵٪ زمان پر شدگی مویرگی در دقایق ۳۰ و ۶۰ در دو گروه

انقباض عروق (Vasoconstriction) محیطی به علت کاهش استرس بیمار می‌باشد (۱). به علاوه، اثرات انقباض عروقی هوشبرهای استنشاقی و وریدی نیز در تشدید این اثر کمک کننده هستند.

بررسی پارامترهای همودینامیک بیماران نشان داد که بیماران دچار نارسایی احتقانی قلب، از ضربان قلب بالاتری نسبت به افراد سالم در قبل از القای بیهوشی برخوردار بودند که این نتیجه، با یافته‌های این مطالعه همخوانی دارد؛ به طوری که Resting tachycardia از علایم اولیه‌ی ابتلا به CHF می‌باشد (۲).

برابر نتایج به دست آمده، در ۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی، تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مشاهده نشد که احتمال می‌رود مداخلات صورت گرفته با القای بیهوشی، توانسته است در کاهش تعداد ضربان قلب در گروه مورد مؤثر واقع گردد.

بررسی فشار خون بیماران در قبل و بعد از القای بیهوشی نشان داد که فشار خون سیستول، دیاستول و متوسط شریانی در قبل از القای بیهوشی در گروه مورد به طور معنی‌داری بالاتر است که علت آن وجود استرس زمینه‌ای در این بیماران می‌باشد (۷). به عبارت دیگر، شاید اطلاع از وضعیت سلامت و خطرات احتمالی ناشی از عمل جراحی و وجود شرایط بیماری قلبی، توانسته است بر میزان استرس بیمار و در نهایت افزایش فشار خون تأثیرگذار باشد.

در بعد از القای بیهوشی در گروه مورد، کاهش بیشتری در فشار خون سیستول، دیاستول و متوسط شریانی مشاهده شد که تأثیر در مورد فشار خون دیاستول بارزتر بود که این یافته نیز با تأثیر داروهای هوشبری که اغلب تضعیف کننده‌ی قلب و سیستم قلبی-عروقی می‌باشد، همخوان است. به عبارت دیگر، بیماران مبتلا به CHF نسبت به اثرات سرکوب قلبی (Cardiodepressant) این داروها حساس‌ترند و افت فشار خون بیشتری نشان می‌دهند (۸).

گروه، معنی‌دار بود ($P < 0/001$). همچنین میانگین BIS دقیقه‌ی ۳۰ در این دو گروه به ترتیب $0/94 \pm 0/34$ و $0/42 \pm 0/16$ و تفاوت دو گروه معنی‌دار بود ($P = 0/008$).

بحث

بررسی پر شدگی مویرگی، روش سریعی برای بررسی گردش خون بافتی است. سرعت گردش خون مویرگی، در کلیه‌ی بافت‌های بدن به طور تقریبی یکسان است. بنا بر این، با بررسی زمان پر شدگی مجدد مویرگ‌های بستر ناخن یا بخش گوشته کف دست، می‌توان گردش خون کاپیلری را در سایر بافت‌های بدن نظیر مغز و قلب نیز ارزیابی کرد و بدین ترتیب، چنین استنباط می‌شود که در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب، این زمان کوتاه‌تر گردد. از این رو، هدف کلی از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر بیهوشی عمومی بر زمان پر شدگی مویرگی در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد بود.

دو گروه مورد و شاهد، از توزیع سنی و جنسی و نوع عمل مشابهی برخوردار بودند و تفاوت معنی‌داری بین ویژگی‌های دموگرافیک بیماران دو گروه مشاهده نشد. بنا بر این، تفاوت‌های مشاهده شده در دو گروه، به احتمال زیاد مربوط به وجود نارسایی قلبی در گروه مورد بوده است.

برابر نتایج این مطالعه، احتمال می‌رود افزایش زمان پر شدگی مویرگی بستر ناخن در گروه شاهد در ۳۰ دقیقه بعد از القای بیهوشی نسبت به قبل از بیهوشی، با کاهش نسبی فشار خون در این فاصله‌ی زمانی قابل توجیه باشد. کاهش CRT در گروه مورد با وجود کاهش فشار خون به طور قابل ملاحظه (۳۰ دقیقه بعد از بیهوشی نسبت به قبل از بیهوشی)، به علت کاهش برون‌ده سمپاتیک مرکزی و کاهش

ناشی از حفظ بیهوشی با عمق کمتر در این بیماران توسط تیم بیهوشی باشد. از آن جایی که این بیماران بر اثرات سرکوبی هوشبرهای استنشاقی و وریدی حساس هستند (۱۲)، تجویز دزهای کمتر از این داورها در دستورالعمل اداره‌ی بیهوشی این بیماران ذکر شده و پیروی از این دستورالعمل منجر به بروز سطح بالاتری از BIS در این بیماران گردیده است. قابل ذکر است تعداد کم بیماران مبتلا به نارسایی قلب که تحت عمل جراحی قرار می‌گیرند، از جمله محدودیت‌های این مطالعه بود که با طولانی‌تر کردن زمان مطالعه، تعداد کافی بیمار به دست آمد.

نتیجه‌گیری نهایی این که بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب از نظر پارامترهای همودینامیک با افراد غیر مبتلا، متفاوت هستند و لازم است در طی مدت عمل، تیم بیهوشی به وضعیت همودینامیک این بیماران توجه خاص داشته باشند. ضمن این که زمان پر شدگی مویرگی در این بیماران طولانی‌تر از افراد عادی است. از این رو، می‌توان در مراقبت‌ها و معاینات قبل از عمل، از این پارامتر نیز به عنوان یک شاخص تعیین کننده در احتمال وجود نارسایی قلبی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای عمومی به شماره‌ی ۳۹۲۱۰۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که با حمایت‌های معاونت پژوهش و فناوری دانشکده‌ی پزشکی به انجام رسید. نویسندگان مقاله از زحمات و حمایت‌های ایشان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

بررسی درجه‌ی حرارت مرکزی در گروه مورد، در قبل و حین بیهوشی، کمتر از گروه شاهد بود که این یافته نیز از مشخصات فیزیولوژیک شناخته شده در زمینه‌ی CHF قابل توجه است. در این بیماران، بدن برای حفظ توزیع خون در اندام‌های حیاتی و حفظ فشار خون، درجه‌ی بالاتری از برون‌ده سیستم سمپاتیک مرکزی دارد و این فعالیت سمپاتیک بالاتر، منجر به انقباض عروق محیطی می‌شود و این انقباض عروق محیطی، کاهش نسبی توزیع خون و در ادامه، کاهش درجه‌ی حرارت محیطی بدن را به دنبال دارد (۹).

میانگین SPO_۲ در حین بیهوشی نسبت به قبل در هر دو گروه مورد و شاهد افزایش داشت و تفاوت بین دو گروه، هم در قبل و هم در حین القای بیهوشی در دو گروه اختلاف معنی دار داشت. تغییرات SPO_۲ با دو مکانیسم قابل توجه است: اول کاهش توزیع خون محیطی و دوم درجات مختصری از ادم ریه (۱۰).

غلظت انتهای بازدمی CO_۲ بالاتر در گروه بیمار، می‌تواند ناشی از تهویه‌ی کمتر ریه‌ها در این دسته باشد. در حین اداره‌ی بیهوشی عمومی، تهویه‌ی مکانیکی ریه‌ها با تغییر فشارهای منفی داخل قفسه‌ی سینه به فشار مثبت منجر به کاهش بازگشت وریدی و افت برون‌ده قلبی و در نتیجه کاهش فشار خون می‌گردد (۱۱). بنابر این، تیم بیهوشی به منظور مقابله با این تغییر، سعی در کاهش فشار متوسط داخل ریوی به وسیله‌ی کاهش حجم جاری و کاهش در تعداد تنفس دارند و این تفاوت می‌تواند عامل سطح بالاتر ETCO_۲ در این بیماران باشد.

برابر نتایج این مطالعه، گروه مورد BIS بالاتری داشتند که می‌تواند

References

1. Strozik KS, Pieper CH, Roller J. Capillary refilling time in newborn babies: normal values. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1997; 76(3): F193-F196.
2. Fuster V, O'Rourke RA, Walsh R, Poole-Wilson P. Hurst's the heart. 12th ed. New York, NY: McGraw Hill; 2007.
3. Lobos AT, Lee S, Menon K. Capillary refill time and cardiac output in children undergoing cardiac catheterization. Pediatr Crit Care Med 2012; 13(2): 136-40.
4. Anderson B, Kelly AM, Kerr D, Clooney M, Jolley D. Impact of patient and environmental factors on capillary refill time in adults. Am J Emerg Med 2008; 26(1): 62-5.
5. Raimer PL, Han YY, Weber MS, Annich GM, Custer JR. A normal capillary refill time of ≤ 2 seconds is associated with superior vena cava oxygen saturations of $\geq 70\%$. J Pediatr 2011; 158(6): 968-72.
6. Evans JA, May J, Ansong D, Antwi S, Asafo-Adjei E, Nguah SB, et al. Capillary refill time as an independent prognostic indicator in severe and complicated malaria. J Pediatr 2006; 149(5): 676-81.
7. Wodey E, Pladys P, Betremieux P, Kerebel C, Ecoffey C. Capillary refilling time and hemodynamics in neonates: a Doppler echocardiographic evaluation. Crit Care Med 1998; 26(8): 1437-40.
8. Pandey A, John BM. Capillary refill time. Is it time to fill the gaps? Med J Armed Forces India 2013; 69(1): 97-8.
9. Gale C. Question 2. Is capillary refill time a useful marker of haemodynamic status in neonates? Arch Dis Child 2010; 95(5): 395-7.
10. Sevransky J. Clinical assessment of hemodynamically unstable patients. Curr Opin Crit Care 2009; 15(3): 234-8.
11. Fleming S, Gill P, Jones C, Taylor JA, Van den Bruel A, Heneghan C, et al. Validity and reliability of measurement of capillary refill time in children: a systematic review. Arch Dis Child 2015; 100(3): 239-49.
12. Ait-Oufella H, Bige N, Boelle PY, Pichereau C, Alves M, Bertinchamp R, et al. Capillary refill time exploration during septic shock. Intensive Care Med 2014; 40(7): 958-64.

The Effect of General Anesthesia on Capillary Refill Time in Patients with Congestive Heart Failure Compared to the Control Group

Mohammad Golparvar MD¹, Saeid Abbasi MD¹, Roya Kasiri²

Original Article

Abstract

Background: Capillary refill time (CRT) largely used as a quick way to assess the cardiovascular system and the status of peripheral blood flow and perfusion in patients. On the other hand, cardiac heart failure is a complex clinical syndrome happens due to improper ventricular function and causes ventricular hypertrophy and dilatation tends to decreasing in cardiac functioning and in capillary refill time. This field sometimes has contradiction and this study aimed to determine the effect of general anesthesia on capillary refill time in patients with congestive heart failure compared to the control group.

Methods: In a prospective cohort study, 50 patients with congestive heart failure and 50 non-affected patients with cardiovascular disease undergoing elective surgery, were selected and both capillary refill time and hemodynamic parameters before induction of anesthesia and 30 minutes after it, were measured and compared.

Findings: The mean capillary refill time before induction of anesthesia was 94.0 ± 21.0 and 76.0 ± 18.0 minutes in patients and controls group and the difference was statistically significant. The mean capillary refill time 30 minutes after induction of anesthesia was significantly higher in patients (90.0 ± 18.0 minutes) compared to the controls (81.0 ± 17.0 minutes) ($P < 0.001$). All hemodynamic parameters were significantly different between the two groups before induction of anesthesia; but in 30 minutes after surgery, systolic blood pressure and heart rate were not significantly different but diastolic blood pressure was significantly different between the two groups.

Conclusion: Patients with congestive heart failure in terms of hemodynamic parameters are different from those without it. It is necessary that during the operation, anesthesiologists should pay special attention to hemodynamic status of these patients. While such patients have longer capillary filling time compared to normal individuals, we can use this parameter as an indicator of the likelihood of heart failure in care and examination before the surgery.

Keywords: Capillary refill time (CRT), Congestive heart failure (CHF), Anesthesia

Citation: Golparvar M, Abbasi S, Kasiri R. **The Effect of General Anesthesia on Capillary Refill Time in Patients with Congestive Heart Failure Compared to the Control Group.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2131-6

1- Associate Professor, Anesthesiology and Critical Care Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Roya Kasiri, Email: k1988@yahoo.com

بررسی اثر میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF-7

دکتر داریوش شهبازی^۱، محمدحسین عسگریان^۲، دکتر سعید ستایشی^۳، سلمان جعفری^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، نقش غلظت یون‌ها و کانال‌های یونی در فرایند چرخه‌ی سلول مورد توجه قرار گرفته است. بررسی نقش کانال‌های یونی در حین مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی، منجر به کشف رابطه‌ای بین پتانسیل غشای سلول و قدرت تکثیر پذیری سلول شده است. با تغییر پتانسیل غشا در حین وقوع چرخه‌ی سلولی، میدان الکتریکی متغیری ناشی از تغییرات پتانسیل به وجود می‌آید که در تقسیم سلول نقش ایفا می‌کند. در این پژوهش، با اعمال میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس و شدت متناسب با میدان به وجود آمده در داخل سلول، تأثیر میدان خارجی بر فرایند تقسیم سلول مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: با استفاده از یک تولید کننده موج متناوب و یک تقویت کننده، میدان‌های الکترومغناطیسی با سه فرکانس و سه شدت مختلف ایجاد گردید. سلول‌های MCF-7 (Michigan cancer foundation-7) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض این میدان‌ها قرار گرفتند. به همراه هر گروه تحت تأثیر میدان، یک گروه شاهد نیز در نظر گرفته شد. تأثیر شدت و فرکانس‌های مورد استفاده بر روی میزان توانایی تکثیر و زنده ماندن رده‌ی سلولی MCF-7 با استفاده از آزمون MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide] به دست آمد.

یافته‌ها: میزان توقف رشد سلولی برای فرکانس ثابت ۱۲۵ کیلوهرتز، تحت شدت‌های ۱/۰۰، ۱/۷۵ و ۲/۵۰ میکروتسلا در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب برابر با ۲/۴۰، ۶/۰۴ و ۹/۲۸ درصد بود. میزان توقف رشد سلولی برای فرکانس ثابت ۱۲۵ کیلوهرتز، تحت شدت‌های ۱/۰۰، ۱/۷۵ و ۲/۵۰ میکروتسلا در مدت زمان ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۵/۶۱، ۸/۶۶ و ۱۱/۹۵ درصد بود. میزان توقف رشد سلولی برای فرکانس ثابت ۱۲۵ کیلوهرتز، تحت شدت‌های ۱/۰۰، ۱/۷۵ و ۲/۵۰ میکروتسلا در مدت زمان ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۱۱/۱۵، ۲۳/۲۶ و ۳۱/۸۲ درصد بود. تحت تأثیر شدت ثابت ۲/۵۰ میکروتسلا برای فرکانس‌های ۱۷۵ و ۲۲۵ کیلوهرتز در مدت زمان ۲۴ ساعت، میزان توقف رشد سلولی به ترتیب برابر با ۶/۵۸ و ۶/۷۹ درصد بود.

نتیجه‌گیری: هر چه مدت زمان اعمال میدان الکترومغناطیسی بیشتر باشد، درصد کاهش تکثیر بیشتر است. از طرفی، با افزایش شدت میدان الکترومغناطیسی اعمال شده نیز تأثیر توقف در تکثیر بیشتر می‌شود؛ اما با افزایش فرکانس، افزایش قابل قبولی در میزان توقف تکثیر مشاهده نمی‌شود. با استفاده از نتایج این تحقیق، می‌توان اعمال میدان در این محدوده‌ی فرکانسی و شدت را در ایجاد اختلال در فرایند تقسیم سلولی سلول سرطانی MCF-7 مؤثر دانست.

واژگان کلیدی: میدان‌های الکترومغناطیسی، میزان توقف رشد سلولی، پتانسیل غشا

ارجاع: شهبازی داریوش، عسگریان محمدحسین، ستایشی سعید، جعفری سلمان. بررسی اثر میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر روی

رده‌ی سلول سرطانی MCF-7. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۲): ۲۱۴۲-۲۱۳۷

مقدمه

در طی سالیان متمادی، بررسی اثر میدان‌های الکترومغناطیسی بر روی موجودات زنده و استفاده از این امواج در تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف مورد بحث و بررسی بوده است. یکی از زمینه‌های تحقیقاتی مورد توجه، اثر این میدان‌ها بر روی سلول‌های زنده‌ی سالم و سرطانی می‌باشد. بر اساس تحقیقات صورت گرفته،

مشخص شده است که میدان‌های الکترومغناطیسی می‌توانند بر روی سلول‌های زنده تأثیر بگذارند و عملکرد آن‌ها را تغییر دهند (۵-۱). زمانی که تغییری موقتی و گذرا در پتانسیل غشای سلول‌ها روی می‌دهد، پتانسیل داخل غشا بر اثر نفوذ یون به سرعت بالا می‌رود و سپس به سرعت پایین می‌آید. این تبادل یون‌ها در کانال‌های یونی و ماتریس خارج سلولی، باعث ایجاد پتانسیل عمل می‌شود (۶).

۱- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۳- دانشیار، دانشکده‌ی فیزیک و مهندسی انرژی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

(۱۸). در گروهی از بررسی‌ها، به فعالیت ضد توموری این میدان‌ها پرداخته شده است که نتایج تعدادی از آزمایش‌ها، حاکی از آن است که این میادین الکترومغناطیسی، توان اثر بر رشد تومور و مهار فرایند تکثیر سلولی و یا تحریک وقوع آپوپتوز را دارا می‌باشند (۱۹). هدف اصلی این پژوهش، بررسی و مقایسه‌ی اثر اعمال میدان الکترومغناطیسی در محدوده‌ی فرکانسی پایین (۱۰ کیلوهرتز تا ۱ مگاهرتز) در ایجاد اختلال در روند تقسیم سلولی سلول‌های سرطانی MCF-7 (Michigan cancer foundation-7) است.

روش‌ها

در این پژوهش، اثر میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس ۱۲۵، ۱۷۵ و ۲۲۵ کیلوهرتز و با شدت ۱/۰۰، ۱/۷۵ و ۲/۵۰ میکروتسلا بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF-7 در مرکز پژوهش‌های سرطان دانشگاه شهید بهشتی تهران مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تولید میدان‌های متناوب، مدار تولید کننده‌ی امواج متناوب در این محدوده‌ی فرکانسی طراحی و ساخته شد. جهت اندازه‌گیری توان مدار برای اعمال میدان، ابتدا امپدانس سلول و محیط کشت مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در تمام مراحل آزمایش، صحت شدت و فرکانس مدار توسط اسیلوسکوپ سیار مدل DSO-2090 USB مورد تأیید قرار گرفت. برای تعیین بهترین آلیاژ الکترو، الکترودهایی از جنس آلیاژهای مختلف ساخته شد و بر اساس آزمون $MTT [3-(4,5\text{-dimethylthiazol-2-yl})-2,5\text{-}]$ ، آلیاژ برنج که کمترین تأثیر را بر روی حیات سلولی داشت، انتخاب گردید.

برای اعمال میدان مد نظر به رده‌ی سلولی تحت مطالعه، الکترودها بر روی درب پلیت کشت سلولی قرار گرفت. این الکترودها، به پایانه‌ی خروجی مدار متصل گردید و برای تطابق امپدانس اتلافی بین سطح الکترو و محیط کشت، شدت میدان بالاتری اعمال شد. این عمل، باعث جبران افت ولتاژ مستقیم اتلافی ناشی از امپدانس محیط شد.

قبل از قرار دادن الکترودها در محیط کشت، عمل استریل کردن در سه مرحله انجام گرفت. در مرحله‌ی اول، الکترودها زیر هود آزمایشگاه با استفاده از شعله‌ی معمولی حرارت داده شد. در مرحله‌ی بعد، با الکل شستشو داده شد و در نهایت پس از ۳ دقیقه، درب الکترودی به وسیله‌ی محلول آماده شده‌ی بافر شستشوی سلول PBS (Phosphate-buffered saline) به همراه HBSS (Hanks' balanced salt solution)، توسط گاز استریل دیگر شستشو داده شد. نحوه‌ی قرارگیری الکترودها در محیط کشت در شکل ۱ نمایش داده شده است.

برای کشت رده‌ی سلولی مورد مطالعه، از محیط کشت DMEM به علاوه‌ی ۱۰۰ واحد پنی سیلین/استرپتومایسین در هر میلی‌لیتر و نیز

دست‌یابی به دانش دینامیک یون‌ها که می‌توان به عنوان نمونه، نقل و انتقال یون کلسیم، یون هیدروژن و پمپ‌های مرتبط با این دو یا حس‌گرهای حساس به ولتاژ را نام برد، در فعالیت سیگنالینگ سلول، به انقلابی در این حوزه تعبیر شده است. در نتیجه، در دهه‌ی اخیر، بررسی نقش یون‌ها و کانال‌های یونی در سیگنالینگ درون سلولی و خارج سلولی انواع سلول‌ها، نقش بسیار مهمی به خود گرفته است (۷). تحقیقات گوناگون نشان دهنده‌ی تغییر شیب غلظتی یون‌ها و بیان کانال‌های یونی در حین فرایند چرخه‌ی سلولی بوده است. این تغییرات با دید فیزیولوژیکی، در پنج نوع فعالیت سلولی (شامل قدرت تکثیر سلول، تمایز یافتن سلول، کنترل حجم سلول، ته‌اجم به دیگر نواحی و مرگ سلولی)، به صورت قابل ملاحظه‌ای اثرگذار است (۸). گروهی دیگر از تحقیقات انجام شده، نشان‌گر اثر پتانسیل داخلی و خارجی سلول بر روی فعالیت جریان یونی بین غشای سلول و کارایی سلول است (۹-۱۰).

همچنین، تحقیقات آزمایشگاهی تغییر غلظت‌های کانال‌های یونی را در حین چرخه‌ی سلولی، در مراحل مختلف مورد بررسی قرار داده و مشخص نموده‌اند که پتانسیل غشا در مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی متفاوت است و این پتانسیل باعث تولید میدان الکتریکی می‌شود (۱۱-۱۲).

در ساده‌ترین حالت، معادل الکتریکی غشای سلول به صورت یک خازن موازی با یک مقاومت نمایش داده می‌شود. در مورد میدان‌های مستقیم (DC یا Direct current) و میدان‌های متناوب (AC یا alternating current) در محدوده‌ی فرکانسی خیلی پایین (Extremely low frequency یا ELF) به علت مقاومت بالای غشای سلول، میدان داخل سلول بسیار ناچیز است، اما میدان خارجی تغییر شکل پیدا می‌کند. در محدوده‌ی فرکانسی بالا، تفاوت بسیار زیادی بین دی الکتریک محیط و غشای سلول دیده نمی‌شود و در نتیجه، درجه‌ی نفوذ پذیری میدان، به مقدار بسیار زیادی افزایش می‌یابد. مقاومت بسیار بالای غشای سلولی در محدوده‌ی فرکانسی خیلی پایین در برابر میدان خارجی، باعث تجمع بارهای الکتریکی در برخی نواحی غشا می‌شود، که همین عامل سبب بر هم زدن خطوط میدان خارجی و نیز شارژ شدن ظرفیت خازنی غشای سلول خواهد شد (۱۳-۱۴).

فعالیت الکتریکی سلول، نقش بسیار مهمی در فرایندهای بیولوژیکی بدن ایفا می‌کند. به عنوان نمونه، در فرکانس‌های کمتر از ۱ کیلوهرتز، میدان خارجی موجب برانگیخته شدن و تحریک عصبی، ماهیچه‌ای و تحرکات قلبی می‌شود (۱۵). همچنین، در فرکانس‌های بالای چند مگاهرتز، اثرات گرمایی بافت در درمان تومور توسط گرما کاربرد دارد (۱۶-۱۷). در فرکانس‌های بسین ۱۰ کیلوهرتز تا ۱ مگاهرتز، تحریک عصبی یا ماهیچه‌ای و اثر گرمایی دیده نشده است

داخل انکوباتور منتقل گردید. پس از گذشت حدود ۴ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج شد و سپس به هر چاهک، به میزان ۸۰۰ میکرولیتر ماده‌ی DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه گردید.

جهت خواندن چگالی نوری از دستگاه خوانش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) استفاده شد. درصد زنده ماندن سلول‌ها از تقسیم چگالی نوری سایر گروه‌ها به گروه شاهد به دست آمد. میزان توقف رشد سلولی از تفریق کسر زنده ماندن از عدد یک محاسبه گردید. برای مقایسه‌ی تأثیر میدان در بین گروه‌های سلولی تحت مطالعه، از آزمون آماری ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها

میزان توقف تکثیر سلولی برای فرکانس ۱۲۵ کیلوهرتز در شدت ۱/۰۰، ۱/۷۵ و ۲/۵۰ میکروتسلا و در مدت‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید. مقادیر به دست آمده در جدول ۱ آمده است.

برای بررسی اثر فرکانس، درصد توقف تکثیر سلولی در شدت ثابت ۲/۵۰ میکروتسلا و در فرکانس‌های ۱۲۵، ۱۷۵ و ۲۲۵ کیلوهرتز و برای مدت‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید. مقادیر حاصل، در جدول ۲ آمده است.

مقایسه‌ی میزان تأثیر زمان تابش در بین گروه‌های سلولی تحت آزمایش در جداول ۱ و ۲ با آزمون آماری One-way ANOVA. نشان داد که بین زمان‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد. همچنین، با افزایش زمان، میزان توقف تکثیر سلولی در یک فرکانس خاص برای شدت‌های مختلف مورد استفاده، افزایش یافت.

۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal bovine serum) استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در فلاسک‌های T-25 ریخته شد و سپس در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرار گرفت. جهت تریپسین کردن سلول‌ها، از محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۰۳ درصد در بافر نمکی استفاده شد. برای بررسی اثر میدان و فرکانس و مدت زمان اعمال میدان، از سه گروه سلولی شامل یک گروه به عنوان گروه شاهد فقط در محیط کشت معمولی فاقد میدان، گروه دارای الکتروود بدون اعمال میدان و گروه دارای الکتروود با اعمال میدان استفاده شد. برای این کار، از پلیت‌های ۶ خانه‌ای استفاده شد؛ بدین صورت که ۳ چاهک مورد اعمال میدان الکترومغناطیسی، ۱ چاهک بدون اعمال میدان اما دارای الکتروود (به جهت بررسی اثر حضور خود الکتروود) و ۱ چاهک بدون الکتروود به جهت شاهد اصلی قرار گرفت. برای هر فرکانس و هر شدت میدان، سه بار اندازه‌گیری انجام پذیرفت و میانگین اعداد به دست آمده، محاسبه گردید. اعمال میدان‌های مختلف بر روی رده‌ی سلولی در داخل انکوباتور انجام شد. میزان توقف رشد و تکثیر سلول‌ها در اثر اعمال میدان با آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت. پس از قطع مدار و خارج کردن ظرف کشت از داخل انکوباتور، بلافاصله در زیر میکروسکوپ نوری، آلودگی سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت و در صورت عدم آلودگی به زیر هود برده شد. سپس، محیط کشت سلول از درون چاهک‌ها خارج گردید و به اندازه‌ی ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. پس از انجام مراحل استریل، درب خود پلیت جاگذاری شد و به



(ب)



(الف)

شکل ۱. الف: نحوه‌ی نصب الکتروودها بر روی درب پلیت ۶ چاهکی. ب: نحوه‌ی قرار دادن درب الکتروود درون ظرف کشت.

جدول ۱. درصد توقف تکثیر سلولی در فرکانس ثابت ۱۲۵ کیلوهرتز و شدت‌های ۱، ۱/۷۵ و ۲/۵ میکروتسلا و در مدت‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

مقدار P	زمان (ساعت)			شدت (میکروتسلا)
	۷۲	۴۸	۲۴	
۰/۰۳۰	۱۱/۱۵	۵/۶۱	۲/۶۰	۱/۰۰
۰/۰۰۴	۲۳/۲۶	۸/۶۶	۶/۰۴	۱/۷۵
۰/۰۰۴	۳۱/۸۲	۱۳/۹۸	۹/۲۸	۲/۵۰

جدول ۲. درصد توقف تکثیر سلولی در شدت ثابت ۲/۵۰ میکروتسلا و در فرکانس‌های ۱۲۵، ۱۷۵ و ۲۲۵ کیلوهرتز و برای مدت‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

مقدار P	زمان (ساعت)			فرکانس (کیلوهرتز)
	۲۴	۴۸	۷۲	
۰/۰۰۴	۳۱/۸۲	۱۳/۹۸	۹/۲۸	۱۲۵
۰/۰۰۲	۲۸/۲۷	۱۲/۶۱	۶/۵۸	۱۷۵
۰/۲۳۰	۱۷/۴۰	۱۰/۴۰	۶/۷۹	۲۲۵

میدان الکترومغناطیسی خارجی بر اساس فرکانس میدان اعمالی، می‌توان میدان درون و برون سلول را تحت تأثیر قرار داد (۱۱، ۷). با وجود این دیدگاه، می‌توان بدین صورت اثر میدان را بر تکثیر بیان کرد؛ به نحوی که میدان اعمالی خارجی، باعث بروز اختلال در رد و بدل کردن مواد در حین فرایند چرخه‌ی سلولی می‌شود. این اثر را می‌توان ناشی از نیروی دی‌الکتروفورزی دانست که به صورت متناوب به ذرات دوقطبی و باردار درون سلول اعمال می‌شود؛ به نحوی که با تناوب متناسب با فرکانس، در لحظه‌ای ذره را به سمت میدان بیشتر و یا الکتروود مثبت حرکت می‌دهد و در لحظه‌ای دیگر، که علامت دو قطب الکتروود تغییر می‌کند، ذره تمایل به رفتن در جهت عکس خود را دارد. اگر فرکانس اعمالی با خاصیت دی‌الکتریک و رسانایی ذره و محیط آن متناسب باشد؛ به گونه‌ای که سلول توان پاسخ‌گویی به تغییر فرکانس را داشته باشد، ذره‌ی باردار یا دوقطبی درون سلول، به گونه‌ای فریز می‌شود و در جای خود شروع به چرخش می‌کند (۱۴).

تا کنون نتایج مطالعات، نشان دهنده‌ی این مکانیزم به صورت قطعی نبوده است و گزارش‌های مکانیزم عمل، با احتیاط‌های علمی فراوانی به کار می‌رود که با پیشرفت روزافزون ابزار آلات آزمایشگاهی، توان پی بردن به مکانیزم این عمل نیز میسر خواهد بود. اما مورد بسیار با اهمیت در این تحقیق، توان تعمیم این گروه از آزمایش‌ها در حوزه‌ی In-vivo و حتی بیمار است؛ چرا که به سبب محدودی فرکانسی، هیچ‌گونه محدودیتی در اعمال میدان وجود ندارد. در فرکانس خیلی پایین، به جهت عدم نفوذ به بافت لازم است که شدت میدان به میزان زیادی افزایش پیدا کند و یا در فرکانس بسیار بالا، به دلیل ایجاد گرمای شدید، نمی‌توان به صورت مطلوب انتظار اثر مورد نظر را درون سلول داشت. همچنین، ابزار ایجاد چنین میدانی با محدودی شدتی میکروتسلا در فرکانس پایین، نسبت به میدان با فرکانس‌های خیلی کم و شدت بسیار زیاد، هزینه‌ی بسیار کمی را به همراه دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد محمدحسین عسگریان به شماره‌ی طرح تحقیقاتی ۳۹۲۵۵۱ در دانشگاه علوم پزشکی

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده، مشخص گردید که برای فرکانس‌های مورد استفاده، هر چه مدت زمان اعمال میدان به صورت متناوب و بدون وقفه به سلول‌های سرطانی بیشتر باشد، میزان درصد توقف در تکثیر سلول‌ها نیز بیشتر می‌شود. از طرفی، هر چه شدت اعمال میدان بیشتر باشد، به علت افزایش قدرت کنترل مواد قطبی و یا باردار، منجر به بالا رفتن درصد توقف تکثیر سلول می‌شود. اما از سوی دیگر، افزایش فرکانس منجر به بالا رفتن قدرت کنترل تکثیر نمی‌شود؛ این عدم تأثیر افزایش فرکانس، می‌تواند ناشی از مشخصات الکتریکی سلول‌های MCF-7 باشد که به طور کامل مربوط به مشخصات دی‌الکتریک و رسانایی سلول در یک فرکانس خاص است.

می‌توان گفت که فرکانس بهینه در مورد این سلول، می‌تواند مابین فرکانس‌های ۱۲۵ و ۱۷۵ کیلوهرتز باشد و در این محدوده‌ی فرکانسی است که میزان ضریب رسانایی الکتریکی سلول و ضریب دی‌الکتریک آن، به طور تقریبی یکسان است. این مشخصه‌ی الکتریکی سلول در این حوزه‌ی فرکانسی باعث می‌شود، درصدی از تأثیر آن، شبیه به محدوده‌ی فرکانسی بسیار پایین باشد که تنها بر روی محیط خارج سلول اثر می‌گذارد و مرتبط با خاصیت رسانندگی سلول است.

از طرفی، درصدی از اثرگذاری آن به طور کامل مرتبط با میدان‌های با فرکانس بالا می‌باشد که از دی‌الکتریک سلول ناشی می‌شود. در نتیجه، در این محدوده‌ی فرکانسی، میدانی که اعمال می‌شود، هم باعث تغییر میدان خارج سلولی می‌شود و هم میدان داخل سلولی را تغییر خواهد داد.

حال از یک سو، در حین فرایند چرخه‌ی سلولی، سلول به واسطه‌ی مبادلات یونی خود و عوامل دیگری که در این پژوهش مد نظر قرار نگرفته است، از جمله پلاریزه شدن مواد دارای خاصیت دی‌الکتریک درون سلول و جابه‌جایی آن‌ها، یک میدان الکتریکی به وجود می‌آید که پس از تحریک اولیه‌ای که از درون یا برون سلول صورت می‌پذیرد، همانند مسیر و یا ابزاری، موجب وقوع عوامل آشکار گونه‌ی دیگر می‌شود. به بیان دیگر، با ایجاد تغییر غلظت کانال‌های یونی، میدان تولید می‌شود و از طرفی، اختلال در این میدان، باعث عدم مبادلات یونی می‌گردد. اما از سوی دیگر، با اعمال

مرکز پژوهش‌های سرطان دانشگاه شهید بهشتی که در انجام این تحقیق کمال همکاری و مساعدت را نموده‌اند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

اصفهان است. نویسندگان از زحمات آقایان اظهري و منصوري و لرنو و شرکت جویندگان راه سلامت (جرس) و جناب آقای دکتر اکبری و

References

- Ahmadi Z, Shahbazi-Gahrouei D, Hashmi-Beni B, Karbalaee M. Effects of exposure to 900-MHz mobile-telephony radiation on growth and metabolism of human-adipose-derived stem cells. *J Isfahan Med Sch* 2014; 32(316): 2269-78. [In Persian].
- Shahbazi D, Shiri L, Alaei H, Naghdi N, Kermani S, Afrouzi H, et al. The effect of extremely low-frequency magnetic fields on the level of serotonin metabolite in the raphe nuclei of adult male rat. *J Isfahan Med Sch* 2014; 32(298): 1354-62. [In Persian].
- Shahbazi-Gahrouei D, Karbalaee M, Moradi HA, Baradaran-Ghahfarokhi M. Health effects of living near mobile phone base transceiver station (BTS) antennae: a report from Isfahan, Iran. *Electromagn Biol Med* 2014; 33(3): 206-10.
- Shahbazi-Gahrouei D, Razavi Sh, Salimi M. Effect of extremely low-frequency (50 Hz) field on proliferation rate of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Radiobiology* 2014; 1(2): 31-7.
- Razavi S, Salimi M, Shahbazi-Gahrouei D, Karbasi S, Kermani S. Extremely low-frequency electromagnetic field influences the survival and proliferation effect of human adipose derived stem cells. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 25.
- Schwieging CJ. A brief historical perspective: Hodgkin and Huxley. *J Physiol* 2012; 590(Pt 11): 2571-5.
- Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A. K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr Biol* 2008; 221(1): 1-6.
- Spitzner M, Ousingsawat J, Scheidt K, Kunzelmann K, Schreiber R. Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J* 2007; 21(1): 35-44.
- Binggeli R, Weinstein RC. Deficits in elevating membrane potential of rat fibrosarcoma cells after cell contact. *Cancer Res* 1985; 45(1): 235-41.
- Foster KR, Schwan HP. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. *Crit Rev Biomed Eng* 1989; 17(1): 25-104.
- Takashima S, Schwan HP. Alignment of microscopic particles in electric fields and its biological implications. *Biophys J* 1985; 47(4): 513-8.
- Sowers AE. Characterization of electric field-induced fusion in erythrocyte ghost membranes. *J Cell Biol* 1984; 99(6): 1989-96.
- Goater AD, Pethig R. Electrorotation and dielectrophoresis. *Parasitology* 1998; 117(Suppl): S177-S189.
- Maier H. Electrorotation of colloidal particles and cells depends on surface charge. *Biophys J* 1997; 73(3): 1617-26.
- Gottwald E, Sontag W, Lahni B, Weibezahn KF. Expression of HSP72 after ELF-EMF exposure in three cell lines. *Bioelectromagnetics* 2007; 28(7): 509-18.
- Cameron IL, Short NJ, Markov MS. Safe alternative cancer therapy using electromagnetic fields. *The Environmentalist* 2007; 27(4): 453-6. [In Persian].
- Tofani S, Barone D, Cintorino M, de Santi MM, Ferrara A, Orlassino R, et al. Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. *Bioelectromagnetics* 2001; 22(6): 419-28.
- Pirozzoli MC, Marino C, Lovisollo GA, Laconi C, Mosiello L, Negroni A. Effects of 50 Hz electromagnetic field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line. *Bioelectromagnetics* 2003; 24(7): 510-6.
- Holzel R, Lamprecht I. Electromagnetic fields around biological cells. *Neural Network World* 1994; 4(3): 327-3.

The Influence of Low-Frequency Electromagnetic Fields (ELFs) on MCF-7 Cancer Cells

Daryoush Shahbazi-Gahrouei PhD¹, Mohammadhossien Asgarian², Saeed Setayeshi PhD³,
Salman Jafari MSc⁴

Original Article

Abstract

Background: The role of ion channels and ion concentrations in cell cycle events is noted in recent years. Investigation of the role of ion channels during different cell cycle phases tend to discover a relationship between the potential of cell membrane and cell proliferation ability. A variable electric field is produced due to changes in cell membrane potential that plays role in cell division. In this study, inducing external fields with similar intensity and frequency proportion to those fields in cell membrane, the effects of low-frequency electromagnetic fields (ELFs) on viability and proliferation ability of MCF-7 cancer cells was evaluated.

Methods: Electromagnetic fields with three different intensities and frequencies were produced using an alternative wave generator and an amplifier. MCF-7 cells were exposed to electromagnetic fields (EMFs) for 24, 48 and 72 hour. Along with each treated cell group, a control group was considered. The influence of electromagnetic fields on cells viability and proliferation was examined using MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide] assay.

Findings: The relative frequency of cell growth inhibition for constant frequency of 125 kHz, for intensities of 1.00, 1.75 and 2.50 microtesla and exposure time of 24 hours was 2.40, 6.04 and 9.28 percent, respectively. For the exposure time of 48 hours and the same frequency and intensities, the relative frequency was 5.61, 8.66 and 11.95 percent, respectively. Under the same conditions and for the exposure time of 72 hours, the relative frequency was 11.15, 23.26 and 31.82 percent, respectively. For constant intensity of 2.5 microtesla and frequencies of 175 and 225 kHz, the relative frequency of cell growth inhibition for 24 hours was 6.58 and 6.79 percent, respectively.

Conclusion: The relative frequency of cell proliferation rate reduced with increase of exposure time as well as intensity of electromagnetic fields. However, it does not notably change with increasing frequency. According to finding of this study, it can be concluded that electromagnetic fields with frequency and intensity in this range can disturb the division cycle of MCF-7 cells.

Keywords: Electromagnetic fields (EMFs), Cell growth inhibition rate, Membrane potential

Citation: Shahbazi-Gahrouei D, Asgarian M, Setayeshi S, Jafari S. **The Influence of Low-Frequency Electromagnetic Fields (ELFs) on MCF-7 Cancer Cells.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2137-42

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

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

3- Associate Professor, School of Physics and Energy Engineering, Amirkabir University, Tehran, Iran

4- PhD Candidate, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mohammadhossien Asgarian, Email: asgarian@jarasco.com

بیان و تخلص ناحیه‌ی کینازی پروتئین نو ترکیب گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی نوع 2b و بررسی تغییرات ساختاری آن بر اثر برهم‌کنش آن با گالیک اسید

فائزه سید عطاران^۱، دکتر داریوش ایلغاری^۱، دکتر نعمت‌اله غیبی^۳، دکتر مهدی سهمانی^۴، دکتر حسین پیری^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی 2b (Fibroblast growth factor receptor 2b یا FGFR2b) در مسیر پیام‌رسانی سلولی و تنظیم فرایندهای مهم زیستی نظیر تمایز و تکثیر سلولی نقش اساسی دارد. تغییرات ژنتیک نظیر جهش نقطه‌ای در ناحیه‌ی تیروزین کینازی FGFR2b با سرطان پستان، تخمدان و پروستات در ارتباط است. این مطالعه، به منظور بیان و خالص‌سازی مقدار مناسبی از ناحیه‌ی کینازی FGFR2b انسانی و بررسی تغییرات ساختاری آن با گالیک اسید انجام شد.

روش‌ها: بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد القا و با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) یا SDS-PAGE ارزیابی شد. پروتئین بیان شده با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص شد و فعال بودن نمونه‌ی پروتئین بعد از دیالیز بررسی شد. طیف فلورسانس و دنا تورا سیون شیمیایی پروتئین خالص شده، در حضور غلظت‌های مختلف گالیک اسید سنجیده شد.

یافته‌ها: بررسی SDS-PAGE قبل و بعد از القا شدن نشان داد که پروتئین بیان شده در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد محلول است. همچنین، تأیید کرد که پروتئین خالص شده است. بررسی طیف‌سنجی فلورسانس، افزایش شدت نشر را با افزایش تدریجی غلظت گالیک اسید نشان داد. دنا تورا سیون شیمیایی ساختار سوم زیر واحدهای ناحیه‌ی کینازی را در حضور گالیک اسید تغییر داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نو ترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b که یک پروتئین ۳۸ کیلودالتونی است، تولید و خالص گردید. تغییرات ساختار سوم دومین کینازی، موجب ناپایدار شدن آن در حضور گالیک اسید گردید. این ناپایداری در سطح مولکولی، می‌تواند موجب اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول شود.

واژگان کلیدی: گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاست نوع ۲، گالیک اسید، اسپکترومتری فلورسانس

ارجاع: سید عطاران فائزه، ایلغاری داریوش، غیبی نعمت‌الله، سهمانی مهدی، پیری حسین. بیان و تخلص ناحیه‌ی کینازی پروتئین نو ترکیب گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی نوع 2b و بررسی تغییرات ساختاری آن بر اثر برهم‌کنش آن با گالیک اسید. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛

۳۳ (۳۶۲): ۲۱۵۱-۲۱۴۳

مقدمه

گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی (FGFR یا Fibroblast growth factor receptor) در مسیر پیام‌رسانی سلول، نقش کلیدی در تنظیم فرایندهای زیستی از جمله تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و تمایز سلولی ایفا می‌کنند (۱). متابولیسم سلولی، ترمیم بافتی، رگ‌زایی و توسعه‌ی مراحل جنینی، از جمله وظایفی هستند که

در دوران جنینی و بزرگ‌سالی در بدن توسط این گیرنده‌ها با اتصال به عوامل رشد فیبروبلاستی (FGF یا Fibroblast growth factor) انجام می‌شوند (۲). عوامل رشد فیبروبلاستی در پستانداران شامل خانواده‌ای از ۱۸ عضو هستند که از طریق چهار گیرنده‌ی تیروزین کینازی (FGFR1 تا FGFR4) ایجاد پیام می‌کنند (۳). مشخص شده است که انتقال پیام کنترل نشده‌ی عوامل رشد

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

۲- استادیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌فن‌آوری پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین پیری

Email: hosseinpiry@gmail.com

تغییرات ژنتیک در این گیرنده با سرطان‌های اندومتریال، تخمدان و پستان در ارتباط است (۱۴). قابل ذکر است که نوع جهش یافته‌ی گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی در تعدادی از سرطان‌ها گزارش شده است که با افزایش پیام مرتبط با این گیرنده، ارتباط دارد (۱۵). با توجه به بررسی انجام شده در متون علمی، گزارشی به دست نیامد که در آن، با استفاده از روش مطالعه‌ی حاضر، این پروتئین نوترکیب بیان شده باشد.

قابل ذکر است که تهیه‌ی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b، به صورت خالص این امکان را فراهم کرد که در مطالعات بتوان اطلاعاتی راجع به ساختار و نیز بررسی برهم‌کنش پروتئین و لیگاند از جمله اثر مهار کننده‌های مختلف را روی ناحیه‌ی کینازی این پروتئین به دست آورد. بنا بر این، مطالعه‌ی حاضر با هدف بیان و خالص‌سازی و بررسی اثر برهم‌کنش با فلاونوئیدها از جمله گالیک اسید مقدار مناسبی از ناحیه‌ی کینازی FGFR2b انسانی انجام شد.

روش‌ها

در این تحقیق، ایمیدازول، Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) و Ni^{2+} -NTA و (Dimethyl sulfoxide) DMSO و گالیک اسید از شرکت Sigma، آمپی‌سیلین و HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] از شرکت Merck و باکتری Escherichia coli BL21 (DE3) از شرکت Invitrogen تهیه شدند. بقیه‌ی مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بودند و از شرکت‌های Sigma و Merck تهیه شدند. از باکتری Escherichia coli BL21 (DE3) حاوی پلاسمید pLEICS-01 جهت میزبان بیانی استفاده شد. باکتری در محیط‌های کشت Luria-Bertani broth و LB آگار (Luria broth agar) در حضور ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد.

پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود، توسط محقق با استفاده از cDNA (complementary DNA) ژن FGFR2b سالم تهیه شد؛ که با توجه به جهش‌های مشاهده شده در ژن FGFR2b سلول‌های سرطانی، موتاسیون نقطه‌ای در آن انجام شده بود. در این پروتئین نوترکیب، با انتقال الگوی موتاسیون مشاهده شده در گیرنده‌ی بیان شده در سلول سرطانی به نوع طبیعی پروتئین، شکل فعال و نوترکیب ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین FGFR2b ایجاد شد که دارای جهش حذفی، جهش افزایش عملکرد، جهش از دست دادن عملکرد و Amplification بوده است (۱۶).

پلاسمید pLEICS-01 که حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی

فیبروبلاستی، می‌تواند به بدخیمی در انسان منجر شود (۴). گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی به خانواده‌ای از گیرنده‌های تیروزین کینازی متعلق هستند که همه‌ی آن‌ها یک بخش داخل غشایی، یک ناحیه‌ی خارج سلولی متصل شونده به لیگاند و یک ناحیه‌ی داخل سلولی با خاصیت تیروزین کینازی دارند (۵-۶).

اتصال عامل رشد فیبروبلاستی به گیرنده‌ی خود، باعث جفت شدن گیرنده و به دنبال آن فسفریلاسیون اسید آمینه‌ی تیروزین موجود در ناحیه‌ی کینازی می‌شود که به دنبال آن، قسمت انتهایی کربوکسیل گیرنده فسفریله می‌شود و در نتیجه، گیرنده فعال می‌گردد. این گیرنده‌ها دو سوبسترای اصلی داخل سلولی به اسامی FRS1 و FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate) دارند. با فسفریله شدن اسید آمینه‌ی تیروزین در ناحیه‌ی انتهایی کربوکسیل گیرنده، مکانی برای برهم‌کنش با ناحیه‌ی SH2 (Src homology 2) از سوبسترای اول فراهم می‌شود که آنزیم فسفولیپاز C نوع گاما (PLC γ یا Phospholipase C) است و بدین ترتیب، فسفریله و فعال می‌گردد که به دنبال آن، مسیر فسفوانیزوتید ۳ کیناز Akt و فعال می‌شود یا این که این گیرنده‌ها از طریق فسفریله کردن سوبسترای دوم خود مسیر Mitogen-activated protein kinases (MAPK) را فعال می‌کنند و بدین ترتیب، در انتقال پیام سلولی مشارکت می‌نمایند (۳).

اشکال موتاسیون یافته‌ی گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی در سرطان‌های متعددی از جمله سرطان پستان، معده، پروستات، کولون، رحم و Multiple myeloma شناخته شده است (۷-۹).

اختلال در انتقال پیام این گیرنده‌ها، با چندین اختلال آسیب‌شناسی انسانی مرتبط است، از جمله سندرم‌های اسکلتی مانند سندرم Pfeiffer که به دلیل جهش در ناحیه‌ی کینازی پروتئین FGFR2 ایجاد می‌شود (۱۰).

مشخص شده است که اختلال تنظیمی مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی (که می‌تواند ناشی از تغییرات ژنتیک باشد)، با ایجاد سرطان ارتباط تنگاتنگی دارد و این امر، این گروه از کینازها را به عنوان یک هدف درمانی جالب توجه در درمان سرطان مطرح می‌کند (۱۱-۱۲).

در سال‌های اخیر، چندین مهار کننده‌ی گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی ارایه شده است که نشان دهنده‌ی سطح بالای توجه محققان به این گیرنده‌ها با رویکرد ضد سرطانی آن‌ها است (۷). پروتئین FGFR2b تمایل بالایی به اتصال با لیگاندهای FGF10، FGF7، FGF3، FGF1 و FGF2 دارد. ژن FGFR2b روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱۰ انسان (10q26) قرار گرفته است و ۲۱ اگزون دارد (۱۳).

جدا شد. غلظت پروتئین مورد نظر که شامل ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b بود، توسط دستگاه NanoDrop با استفاده از ضریب خاموشی $1\text{ cm}^{-1} \times 0.0116$ در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد که بر اساس توالی اسید آمینه محاسبه شده بود.

پروتئین بیان شده با قطعه‌ی پپتیدی دارای ناحیه‌ی SH2 و نیز قطعه‌ی پپتیدی دارای ناحیه‌ی SH2 که در آن دو اسید آمینه‌ی آرژینین به آلانین تبدیل شده بود و فاقد توانایی اتصال به ناحیه‌ی کینازی پروتئین مورد نظر بود (جهت شاهد منفی)، مجاور گردید و با بررسی الگوی حاصل از PAGE، نتایج ارزیابی شد (۱۷). داده‌ها با استفاده از آزمون‌های One-way ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ بررسی شد.

تعیین غلظت پروتئین: با استفاده از دستگاه NanoDrop غلظت پروتئین اندازه‌گیری شد. در این محاسبه، وزن مولکولی پروتئین به میزان ۳۸ کیلوالتون اعمال شد.

مطالعات اسپکتروسکوپی فلوروسنس: برای بررسی ساختار سوم پروتئین تخلیص شده در شرایط متفاوت، از روش فلوروسنس ذاتی استفاده شد. اندازه‌گیری شدت فلوروسنس ذاتی، با دستگاه اسپکتروفلوریمتر واریان کری اکلپس (Varian Cray. Eclipse) مدل Bio 700، حاوی کووت کوارتز (Quartz cuvettes) با طول مسیر ۱۰ میلی‌متر صورت گرفت. طول موج تحریک پروتئین، ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشی ۳۵۰-۳۰۰ نانومتر بود. به منظور از بین بردن اثر پس‌زمینه‌ی بافر حاوی پروتئین روی شدت فلوروسنس، سیستم با استفاده از یک محلول بلانک (Blank solution) صفر شد. پروتئین با غلظت ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. غلظت پروتئین در همه‌ی محلول‌های مورد آزمایش ثابت نگه داشته شد. به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی پروتئینی داخل کووت ۴۰۰ میکرولیتری ریخته شد و با بافر، به حجم نهایی رسید.

به منظور بررسی اثر گالیک اسید روی شدت فلوروسنس پروتئین، چندین محلول حاوی غلظت‌های ثابت از پروتئین در حضور غلظت‌های متفاوت از محدوده‌ی ۵۰۰-۲۵ میکرومولار از گالیک اسید، به طور جداگانه تهیه شد و اثر هر کدام در شرایط طبیعی بررسی گردید. همچنین، با اضافه کردن میزان مناسبی از بافر به هر نمونه، حجم نهایی محلول به میزان ۴۰۰ میکرولیتر نگه داشته شد. سپس طیف نشی بعد از گذشت زمان Incubation به مدت ۲۰ دقیقه گرفته شد. آزمایش‌های اولیه در جهت تعیین حداقل و حداکثر غلظتی از گالیک اسید که روی طیف نشی فلوروسنس اثر می‌گذاشت، صورت گرفت. طیف نشی حاصل از پروتئین در حضور و عدم حضور گالیک اسید با هم مقایسه شد. هر آزمایش دو بار برای هر طیف نشی تکرار شد.

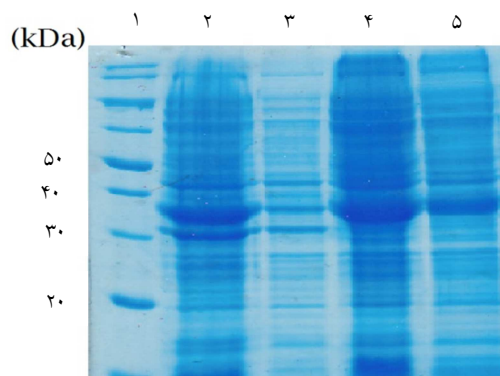
پروتئین نوترکیب FGFR2b بود، به باکتری مستعد Escherichia coli BL21 جهت بیان ژن مورد نظر انتقال داده شد. باکتری‌های تراریخته‌ی حاوی ژن مورد نظر، در محیط مناسب کشت داده شدند و بیان ژن مورد نظر توسط IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار القا گردید. نمونه‌برداری قبل از القا، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از القا انجام و با استفاده از روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) بیان پروتئین مورد نظر ارزیابی شد.

جهت ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده، ابتدا محیط کشت دارای باکتری‌های تراریخته‌ی حاوی ژن مورد نظر، سانتریفیوژ شدند. این باکتری‌ها تحت تأثیر القا توسط IPTG به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفته بودند. جهت ارزیابی حلالیت پروتئین بیان شده پس از القا در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه محیط‌های کشت در سانتریفیوژ با شتاب ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و رسوب سلولی حاصل با اضافه نمودن ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیز سلولی احیا گردید و سپس سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه با استفاده از Sonicator که روی شرایط ۲۰ ثانیه روشن و ۲۰ ثانیه خاموش و بالاترین ولتاژ تنظیم شده بود، Sonicate و لیز شدند.

به منظور آنالیز SDS-PAGE از لایزت سلولی حاصل به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان لایزت کل سلولی، جمع‌آوری شد و همچنین، به مدت ۲۰ دقیقه باقیمانده‌ی لایزت، در سانتریفیوژ با شتاب ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. آن گاه، مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ و رسوب حاصل که در حضور بافر لیز کننده توسط Sonicator لیز شده بود، به روش SDS-PAGE ارزیابی گردید. بافر لیز کننده، حاوی ۲۵ میلی‌مولار Tris-HCl (Tris hydrochloride) و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید با pH برابر ۸ بود. جهت افزایش حلالیت پروتئین بیان شده، از کشت ۲۴ ساعته در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد.

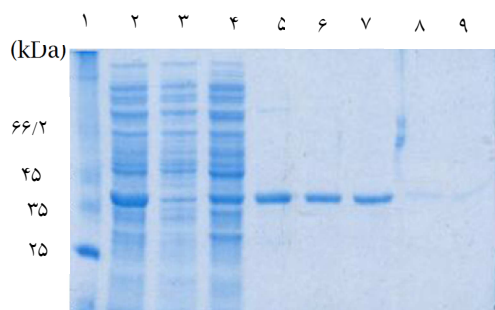
به منظور خالص‌سازی پروتئین بیان شده، رسوب حاوی باکتری‌های تراریخته‌ی دارای ژن مورد نظر، در بافر لیز کننده به مدت یک ساعت با شتاب ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بافر لیز کننده، حاوی ۲۵ میلی‌مولار HEPES، ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و گلیسرول (۱۰ درصد) با pH برابر ۸ بود. محلول شفاف به دست آمده، روی ستون حاوی Ni²⁺-NTA قرار داده شد و پروتئین‌ها با یک شیب غلظتی از ایمیدازول شسته شدند. میزان خلوص پروتئین مورد نظر خارج شده از ستون، توسط روش SDS-PAGE ارزیابی شد.

بعد از مخلوط نمودن نمونه‌های به دست آمده که حاوی پروتئین مورد نظر خالص شده بودند، ایمیدازول با استفاده از دیالیز از محیط



شکل ۲. مقایسه‌ی حلالیت ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) در دو دمای ۲۰ و ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد. ستون ۱: نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع (Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661). ستون‌های ۲ و ۳: به ترتیب نمونه‌ی لیز شده با کتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ستون‌های ۴ و ۵: به ترتیب نمونه‌ی لیز شده با کتری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

الگوی الکتروفورز، خالص‌سازی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni²⁺-NTA را نشان می‌دهد (شکل ۳).



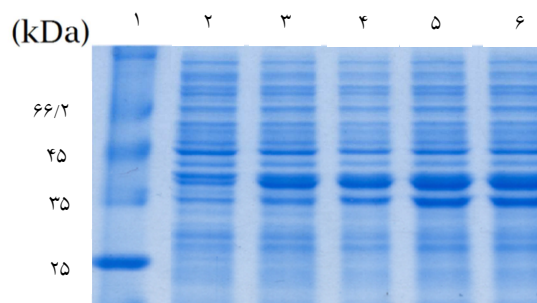
شکل ۳. خالص‌سازی ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی حاوی Ni²⁺-NTA. ستون ۱: نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع (Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661). ستون ۲: نمونه‌ی اولیه قبل از خالص‌سازی، ستون ۳: نمونه‌ی بعد از شستشوی اولیه‌ی ستون کروماتوگرافی و ستون‌های ۴-۹: نمونه‌ها بعد از شستشوی ستون کروماتوگرافی با ایمیدازول با شیب غلظت ۲۰-۵۰ میلی‌مولار

جهت خارج نمودن ایمیدازول از محلول حاوی پروتئین، بعد از تخلیص، پروتئین مورد نظر دیالیز شد و جهت اطمینان از وجود پروتئین و کمیت آن بعد از دیالیز SDS-PAGE انجام شد (شکل ۴).

مطالعات دناتوراسیون شیمیایی با استفاده از اسپکتروسکوپی فلوروسنس: به منظور ارزیابی پایداری Conformation پروتئین تخلیص شده، غلظت‌های متفاوت از گوانیدین هیدروکلراید بین ۰-۶ مولار تهیه شد. طول موج تحریکی روی ۲۸۰ نانومتر تنظیم شد. در حضور حداکثر غلظت مؤثر مشاهده شده در طیف نشری فلوروسنس، یعنی ۵۰۰ میکرومولار از گالیک اسید، دناتوراسیون شیمیایی انجام گرفت. چندین محلول حاوی پروتئین با غلظت ثابت به میزان ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر حاوی ۲۵ میلی‌مولار Tris-Hcl (Tris-hydrochloride) و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl با pH برابر ۷/۵ تهیه شد. غلظت نهایی گوانیدین هیدروکلراید در هر محلول به میزان ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶ مولار بود. طیف نشری در حضور ۵۰ میکرومولار از گالیک اسید به طور جداگانه ثبت شد. در نهایت، طول موج بیشینه‌ی هر نشر برای رسم نمودار در غلظت‌های متفاوت دناتوره کننده استفاده گردید. هر آزمایش دو بار تکرار شد.

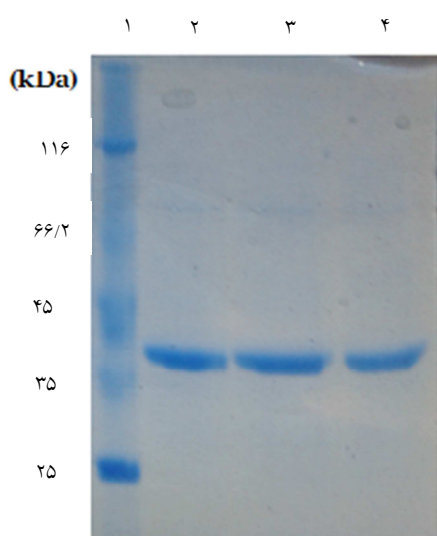
یافته‌ها

نتایج SDS-PAGE نشان داد که بعد از القا توسط IPTG، پروتئین نوترکیب مورد نظر با اندازه‌ی تقریبی ۳۸ کیلودالتون بیان شد و بهترین میزان بیان، ۳-۴ ساعت بعد از القا بود (شکل ۱).



شکل ۱. بیان ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) در باکتری Escherichia coli BL21. ستون ۱: نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع (Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661). ستون ۲: نمونه‌ی لیز شده‌ی باکتری دارای حامل نوترکیب قبل از القا با IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) با غلظت ۱ میلی‌مولار و ستون‌های ۳-۶: نمونه بعد از القا با IPTG به ترتیب در فاصله‌ی زمانی ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد

مقایسه‌ی نمونه‌های حاصل از لیز سلول و مایع رویی نشان داد که پروتئین بیان شده، نامحلول بود و در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد پروتئین مورد نظر در حالت محلول به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۵. نتایج SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-) نتایج

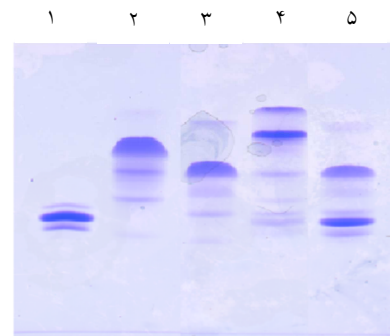
(polyacrylamide gel electrophoresis) بعد از دیالیز.

ستون ۱، نشانگر پروتئینی با دامنه‌ی وسیع

(Bio Basic Inc, Cat No: BSM0661) و ستون ۲ به

بعد نشان دهنده‌ی نمونه‌ی دیالیز شده می‌باشد.

با استفاده از روش فلوروسنس ذاتی، وضعیت ساختار سوم ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b در حضور گالیک اسید بررسی شد. نتایج، افزایش شدت نشر فلوروسنس را در حضور گالیک اسید و با افزایش تدریجی غلظت آن‌ها نشان داد. با تیتراسیون گالیک اسید، تغییرات کمی در شیف‌ت حداکثر طول موج نشری فلوروسنس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر مشاهده گردید (شکل ۶).



شکل ۴. بررسی عملکرد ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b (Fibroblast growth factor receptor 2b) خالص

شده. ستون ۱: ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b.

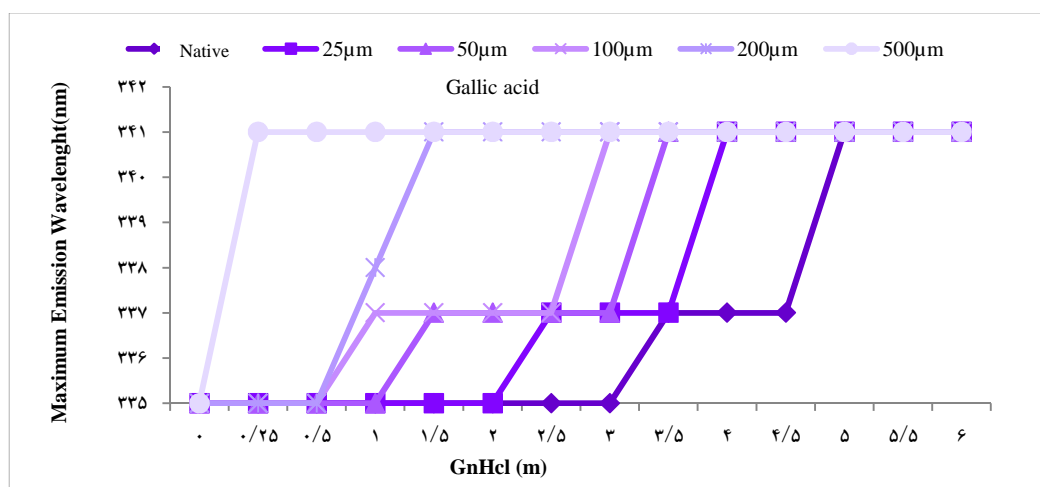
ستون ۲: پپتید دارای ناحیه‌ی SH2 (Src homology 2).

ستون ۳: پپتید دارای ناحیه‌ی SH2 جهش یافته، ستون ۴: مجموعه‌ی

پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی SH2 و ستون ۵: مخلوط حاوی

پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی جهش یافته‌ی SH2

الگوی حاصل از PAGE مشخص کرد که ناحیه‌ی کینازی پروتئین مورد نظر با پپتیدی که دارای ناحیه‌ی SH2 بود، تعامل برقرار کرد (ستون ۴ شکل ۵) و مجموعه‌ی حاصل، دارای الگوی الکتروفورزی متفاوت از هر کدام از دو جزء به تنهایی بود (ستون‌های ۱ و ۲ شکل ۵). در حالی که الگوی الکتروفورزی مخلوط حاوی پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی جهش یافته‌ی SH2 بود که توانایی اتصال به ناحیه‌ی کینازی پروتئین مورد نظر را نداشت (ستون ۵ شکل ۵). با الگوی الکتروفورزی، هر کدام از دو جزء به تنهایی یکسان بود (ستون‌های ۱ و ۳ شکل ۵) که نشان دهنده‌ی عدم اتصال پروتئین مورد نظر با پپتید دارای ناحیه‌ی جهش یافته‌ی SH2 بود.



شکل ۶. افزایش شدت نشر فلوروسنس در حضور گالیک اسید ۲۵-۵۰۰ میکرولیتر و با افزایش تدریجی غلظت (۰-۶ مولار) GdnHCl

(Guanidine hydrochloride) و Native بدون حضور گالیک اسید

بحث

در این مطالعه، ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نوترکیب عامل رشد فیبروبلاستی 2b در باکتری *Escherichia coli* BL21 بیان و به صورت محلول و فعال خالص شد. اگر چه ترکیب‌های مؤثری برای مهار پروتئین کینازها شناسایی شده‌اند، اما مکانیسم مولکولی دقیق این مهارکننده‌ها، در مهار فعالیت پروتئین کینازی به روشنی مشخص نیست (۱۸).

از آن جا که برای انجام مطالعه‌های ساختاری یا بررسی برهم‌کنش بین پروتئین و لیگاند به تهیه‌ی پروتئین خالص شده در حد میلی‌گرم نیاز است. در این مطالعه، در مرحله‌ی اول پلاسمید حاوی ژن ناحیه‌ی تیروزین کینازی پروتئین نوترکیب FGFR2b تحت سیستم بیانی باکتری *Escherichia coli* BL21 قرار گرفت و پروتئین مورد نظر به دست آمد. یکی از مشکلاتی که حین تولید پروتئین ممکن است با آن مواجه شویم نامحلول بودن پروتئین به دلیل تجمع توده‌های غیر فعال پروتئینی به شکل اجسام توده‌ای است. یک علت این امر، می‌تواند بیان بیش از حد پروتئین در سیتوپلاسم باکتری باشد که رفع این مشکل، از نظر زیست‌فن‌آوری اهمیت به‌سزایی دارد. چندین روش برای به حداقل رساندن تشکیل اجسام توده‌ای و دستیابی به پروتئین محلول وجود دارد؛ از جمله تغییر متغیرهایی نظیر درجه‌ی حرارت، میزان بیان و غلظت ماده‌ی القاکننده. از بین این روش‌ها، مهم‌ترین کار تغییر شرایط رشد باکتری است (۱۹).

در این مطالعه، محلول نمودن پروتئین هدف در دماهای مختلف حلالیت بررسی شد که در نهایت در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به صورت محلول درآمد. در مطالعه‌ی Meinander و همکاران اثر دما، غلظت القاکننده و بیان هم‌زمان چاپرون‌ها (Chaperones) را بر روی حلالیت پروتئین بیان شده در باکتری *Escherichia coli* بررسی کردند. در مطالعه‌ی آن‌ها، کاهش دما بیان پروتئین را به صورت محلول دو برابر کرد (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز با کاهش میزان دما افزایش حلالیت پروتئین مشاهده شد. بررسی القای الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های بیان شده، پس از القای ژن مورد نظر با IPTG در این پژوهش انجام شد.

همان گونه که اشاره شد، گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی 2b در تنظیم فرایندهای بیولوژیکی حیاتی از جمله تکثیر سلولی نقش حیاتی دارد. در مطالعه‌ی حاضر با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی، از جمله مطالعات فلوروسنس تغییرات مشاهده شده بر روی ساختار سوم ناحیه‌ی کینازی، در حضور و عدم حضور ترکیبات گالیک اسید بررسی شد. در مطالعه‌های مختلف به منظور بررسی اثر گالیک اسید روی تکثیر سلولی در محیط کشت سلولی از غلظت‌های متفاوتی از گالیک اسید استفاده شده است. به عنوان مثال،

شماری از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که استفاده از گالیک اسید در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند باعث القای مرگ سلولی در فعالیت سلول‌های کبدی شود. در این مطالعه، از حداکثر غلظت گالیک اسید استفاده شد تا اثر افزایش غیر طبیعی غلظت گالیک اسید در رشد سلول‌های سرطانی را تقلید کند (۲۱).

غلظت پروتئین در مطالعه‌ی حاضر، وابسته به تکنیک استفاده شده در این نوع مطالعه است. به منظور انجام مطالعه‌ی فلوروسنس، غلظت مورد نیاز پروتئین ۰/۲-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیاز است (۲۲) که در این مطالعه، از غلظت ۰/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین مورد نظر استفاده شد.

نتایج این مطالعه، افزایش شدت نشر فلوروسنس را در حضور و نیز با افزایش تدریجی غلظت گالیک اسید نشان داد. هر چند با تیراسیون گالیک اسید، تغییراتی در شیف منحنی حداکثر طول موج نشری فلوروسنس به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر مشاهده شد. در مطالعه‌ی ای که توسط Gorinstein و همکاران انجام شد، تغییرات ساختاری پروتئین‌های سرم انسان (HSP یا Human serum protein) با استفاده از روش‌های فلوروسنس اسپکتروسکوپی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که شدت نشر فلوروسنس کاهش یافته و همچنین حداکثر طول موج نشری شیفت پیدا کرده است که این نتایج Unfold شدن پروتئین را نشان می‌دهد (۲۳). در مقایسه با نتیجه‌ی حاصل از مطالعه‌ی حاضر، می‌توان گفت که افزایش شدت نشر فلوروسنس ناحیه‌ی کینازی در حضور گالیک اسید، باعث پنهان شدن اسید آمینه‌های تریپتوفان انتهایی در ساختار پروتئین می‌شود.

به منظور مطالعات بیشتر و بررسی هر چه بیشتر تغییرات مشاهده شده، دنا تراسیون شیمیایی فلوروسنس در حضور گالیک اسید انجام شد. این مطالعات در حضور حداکثر غلظت مؤثر گالیک اسید و در حضور افزایش تدریجی غلظت گوانیدین هیدروکلراید انجام گرفت (۲۴). در مطالعه‌ی حاضر نیز گوانیدین هیدروکلراید باعث دناتورده شدن ناحیه‌ی کینازی شد.

نتایج حاصل از دنا تراسیون شیمیایی نشان داد که فرایند Unfolding ناحیه‌ی کینازی در حالت طبیعی یک فرایند سه مرحله‌ای است. وجود دو حالت گذار در این فرایند، نشان دهنده‌ی Unfold شدن هر Subdomain به طور جداگانه و در غلظت‌های متفاوت از گوانیدین هیدروکلراید است.

بر اساس نتایج، در حین دناتوراسیون تغییرات به وجود آمده روی ساختار سوم موجب ناپایدار شدن آن در حضور گالیک اسید می‌شود. در مطالعات مختلفی گزارش شده است که بعضی از فلاونوئیدها، می‌توانند فعالیت‌های اجزای داخل سلولی مسیر پیام‌رسانی را تغییر دهند (۲۵).

کینازی اثربخش است. با این وجود، مطالعات بیشتری با استفاده از روش‌های دیگر، برای کشف مکانیسم مولکولی دقیق تأثیرات گالیک اسید در سرطان نیاز است.

بررسی ساختار و دینامیک حد واسط‌های مسیر Folding نه تنها به فهم ساز و کار تاخوردگی طبیعی پروتئین‌ها کمک می‌کند؛ بلکه هم در حوزه‌ی بیوتکنولوژی و هم در روشن‌تر کردن علل بسیاری از بیماری‌های مربوط نقش به‌سزایی دارد.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مالی و فنی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و همچنین، مدیریت محترم گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان در اجرا و به نتیجه رسیدن این طرح، قدردانی می‌گردد. این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و به عنوان بخشی از طرح تحقیقاتی با کد ۲۲۷ مصوب مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد.

در این مطالعه، بر اساس نتایج به دست آمده، ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نوترکیب عامل رشد فیروبلاستی 2b که یک پروتئین ۳۸ کیلودالتونی است، تولید و خالص گردید و نشان داده شد که پروتئین مورد نظر به صورت محلول و فعال است و می‌توان از آن جهت بررسی برهم‌کنش پروتئین و لیگاند، از جمله اثر مهار کننده‌های مختلف استفاده نمود.

علاوه بر این، اثر ناپایداری فلاونوئیدها از جمله گالیک اسید روی ناحیه‌ی کینازی گیرنده‌ی نوترکیب عامل رشد فیروبلاستی 2b می‌تواند در سطح مولکولی و درون سلول موجب اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول شود و فرایندهای بیولوژیکی سلولی را دستخوش تغییر نماید. همچنین، نتایج این پژوهش با مطالعات قبلی که کاربرد گالیک اسید را به عنوان یک درمان جانبی در سرطان پیشنهاد می‌کنند، مطابقت دارد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در درمان سرطان‌هایی که مکانیسم به وجود آورنده‌ی آن‌ها اختلال در مسیر پیام‌رسانی سلول به واسطه‌ی گیرنده‌های عامل رشد فیروبلاستی است، استفاده‌ی هم‌زمان از فلاونوئیدها از جمله گالیک اسید در کنار مهار کننده‌های

References

- Matsunaga S, Okigaki M, Takeda M, Matsui A, Honsho S, Katsume A, et al. Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46(5): 663-73.
- Zhao WM, Wang L, Park H, Chhim S, Tanphanich M, Yashiro M, et al. Monoclonal antibodies to fibroblast growth factor receptor 2 effectively inhibit growth of gastric tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2010; 16(23): 5750-8.
- Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(3): 235-53.
- Haugsten EM, Wiedlocha A, Olsnes S, Wesche J. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 2010; 8(11): 1439-52.
- Kalinina J, Dutta K, Ilghari D, Beenken A, Goetz R, Eliseenkova AV, et al. The alternatively spliced acid box region plays a key role in FGF receptor autoinhibition. *Structure* 2012; 20(1): 77-88.
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; 141(7): 1117-34.
- Gartside MG, Chen H, Ibrahim OA, Byron SA, Curtis AV, Wellens CL, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res* 2009; 7(1): 41-54.
- Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(2): 179-86.
- Jain VK, Turner NC. Challenges and opportunities in the targeting of fibroblast growth factor receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012; 14(3): 208.
- Lew ED, Bae JH, Rohmann E, Wollnik B, Schlessinger J. Structural basis for reduced FGFR2 activity in LADD syndrome: Implications for FGFR autoinhibition and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(50): 19802-7.
- Knights V, Cook SJ. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 2010; 125(1): 105-17.
- Katoh Y, Katoh M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *Int J Mol Med* 2009; 23(3): 307-11.
- Katoh M. FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2009; 13(7): 477-82.
- Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review). *Int J Oncol* 2008; 33(2): 233-7.
- Pollock PM, Gartside MG, Dejeza LC, Powell MA, Mallon MA, Davies H, et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. *Oncogene* 2007; 26(50): 7158-62.
- Lew ED, Furdul CM, Anderson KS, Schlessinger J. The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. *Sci Signal* 2009; 2(58): ra6.
- Bae JH, Lew ED, Yuzawa S, Tome F, Lax I, Schlessinger J. The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. *Cell* 2009; 138(3): 514-24.
- Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di BA, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth

- and survival. *Cancer Res* 2008; 68(7): 2340-8.
19. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005; 115(2): 113-28.
 20. Meinander N, Jeppsson M, Sogaard M. Optimisation of the solubility of the recombinant itk kinase domain in *Escherichia coli*. In: Merten OW, Mattanovich D, Lang C, Larsson G, Neubauer P, Porro D, et al., editors. *Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology*. New York, NY: Springer; 2001. p. 159-70.
 21. Sambrook JF, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
 22. Scheim DE. Cytotoxicity of unsaturated fatty acids in fresh human tumor explants: concentration thresholds and implications for clinical efficacy. *Lipids Health Dis* 2009; 8: 54.
 23. Gorinstein S, Goshev I, Moncheva S, Zemser M, Weisz M, Caspi A, et al. Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes. *J Protein Chem* 2000; 19(8): 637-42.
 24. Jana S, Chaudhuri TK, Deb JK. Effects of guanidine hydrochloride on the conformation and enzyme activity of streptomycin adenylyltransferase monitored by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry (Mosc)* 2006; 71(11): 1230-7.
 25. Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 641(2-3): 102-7.

Expression and Purification of the Recombinant Kinase Domain of FGFR2b and Study of its Structural Changes Due to the Interaction with Gallic Acid

Faezeh Seyyed-Attaran¹, Dariush Ilghari PhD², Nematollah Gheibi PhD³, Mehdi Sahmani PhD⁴,
Hossein Piri PhD²

Original Article

Abstract

Background: FGFR2b plays a significant role in cell signaling pathway, regulating several key biological processes including cellular differentiation and proliferation. Genetic alterations of the tyrosine kinase domain of FGFR2b, such as point mutations, occur in breast, ovarian and prostate cancer. This study aimed to express and purify the human FGFR2b kinase domain and to analyze its structural changes upon interaction with Gallic acid (GA).

Methods: Expression of recombinant protein was induced with 1mM IPTG at 37 °C and analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein was purified via affinity chromatography and the protein sample was dialyzed and then used to be analyzed via SDS-PAGE. Chemical denaturation and intrinsic fluorescence spectra of the purified proteins were carried out via adding different concentrations of Gallic acid.

Findings: Comparison between pre- and post-induction samples via SDS-PAGE analysis showed that the expressed protein was soluble at 20 °C. Additionally, its purity was confirmed. The intrinsic fluorescence spectra of kinase domain in the presence of Gallic acid showed an increase in fluorescence intensity and maximum emission wavelength.

Conclusion: Regarding to the results, the recombinant kinase domain of FGFR2b (38 kDa) was expressed, solubilized and purified. Changing in tertiary structural kinase domain reflects a conformational change within the protein that is important for the biological function of FGFR2b.

Keywords: Receptor, Fibroblast growth factor 2, Gallic acid, Spectrometry, Fluorescence

Citation: Seyyed Attaran F, Ilghari D, Gheibi N, Sahmani M, Piri H. **Expression and Purification of the Recombinant Kinase Domain of FGFR2b and Study of its Structural Changes Due to the Interaction with Gallic Acid.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2143-51

1- Department of Biology, School of Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center AND Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

3- Associate Professor, Department of Biophysics and Biotechnology, School of Paramedical Sciences AND Cellular and Molecular Research Centre, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

4- Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center AND Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Corresponding Author: Hossein Piri, Email: hosseinpiri@gmail.com

برنامه‌ی قلب سالم اصفهان: حجم نمونه و ساختارهای نمونه‌گیری

فاطمه نوری^۱، دکتر آوات فیضی^۲، نوشین محمدی‌فر^۱، دکتر نضال صراف‌زادگان^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از راه‌کارهای مهم در پیش‌گیری و کنترل بیماری‌های قلبی-عروقی (CVD یا Cardiovascular diseases)، آموزش از طریق مداخلات در سطح جامعه است. هدف مطالعه‌ی حاضر، تبیین حجم نمونه و ساختار نمونه‌گیری برنامه‌ی قلب سالم اصفهان (IHHP یا Isfahan Healthy Heart Program) به عنوان یک مطالعه‌ی مداخلاتی وسیع جامعه‌نگر، جهت اصلاح شیوه‌ی زندگی و پیش‌گیری و کنترل بیماری‌های قلبی-عروقی و عوامل خطر آن بود.

روش‌ها: IHHP شامل چهار گروه هدف بالغین، کارکنان بهداشتی، بیماران قلبی و دانش‌آموزان در شهرستان‌های اصفهان و نجف‌آباد (مورد) و اراک (شاهد) و مشتمل بر سه مرحله‌ی بررسی وضعیت موجود در سال‌های ۸۰-۱۳۷۹، اجرای مداخلات در سال‌های ۸۵-۱۳۸۱ و بررسی وضعیت بعد از مداخله در سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ بود. هم‌زمان با اجرای مداخلات، چهار بررسی به منظور ارزیابی تغییرات آگاهی و عملکرد افراد نیز انجام گردید.

یافته‌ها: حجم نمونه‌ی مراحل اول و سوم، در بالغین ۱۲۵۱۴ و ۹۵۷۲ نفر و با روش نمونه‌گیری سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، سیستماتیک و تصادفی ساده؛ در دانش‌آموزان ۱۹۴۶ و ۱۹۹۲ نفر و با روش نمونه‌گیری سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده؛ در کارکنان بهداشتی ۹۲۳ و ۲۰۱۵ نفر و در بیماران قلبی ۸۱۴ و ۵۰۲ نفر و با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده بود. افراد بالای ۳۵ سال، مرحله‌ی اول بالغین برای شرکت در یک مطالعه‌ی طولی ۱۰ ساله به نام مطالعه‌ی Cohort اصفهان جهت بررسی بروز و محاسبه‌ی ارزیابی خطر حوادث بیماری‌های قلبی-عروقی انتخاب و پی‌گیری شدند.

نتیجه‌گیری: برنامه‌ی قلب سالم اصفهان از مطالعات مداخلاتی وسیع جامعه‌نگر در ایران به شمار می‌آید و شامل مشترکات زیادی با مطالعات مطرح در سطح دنیا می‌باشد.

واژگان کلیدی: برنامه‌ی قلب سالم اصفهان، بیماری‌های قلبی-عروقی، پیش‌گیری و کنترل، حجم نمونه، ساختار نمونه‌گیری

ارجاع: نوری فاطمه، فیضی آوات، محمدی‌فر نوشین، صراف‌زادگان نضال. برنامه‌ی قلب سالم اصفهان: حجم نمونه و ساختارهای نمونه‌گیری. مجله

دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۲): ۲۱۶۶-۲۱۵۲

مقدمه

چهارم در سال ۱۹۹۰، به رتبه‌ی اول در سال ۲۰۱۰ تبدیل شده است، بهتر خود را نمایان می‌سازد (۴).

نگرانی‌های جهانی در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش نسبت مرگ و میر به علت بیماری‌های قلبی-عروقی در کشورهای در حال توسعه و توسعه نیافته افزایش یافته است (۵). متأسفانه، نزدیک به ۸۰ درصد مرگ‌های ناشی از بیماری‌های قلبی-عروقی و ۸۷ درصد از ناتوانی‌ها، در حال حاضر در کشورهای با درآمد متوسط و پایین اتفاق می‌افتد (۶). در ایران مانند سایر کشورهای با درآمد متوسط، شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی در سال‌های اخیر رو به افزایش بوده است (۷).

به طور کلی، در ایران و ۲۰ کشور از همسایگان آن، بیماری‌های

بیماری‌های قلبی-عروقی، امروزه به عنوان یکی از عوامل اصلی تهدید کننده‌ی سلامتی انسان‌ها در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران شناخته شده است (۱). این بیماری‌ها، مشکلات زیادی را برای بیماران و هزینه‌ی بالایی را برای جامعه به دنبال دارند. همچنین، مهم‌ترین علت مرگ و ناتوانی در کل دنیا می‌باشند (۲). بیماری‌های ایسکمی قلبی (IHD یا Ischaemic heart disease)، مسؤول ۶۲/۶ میلیون سال از دست رفته از ناتوانی در سال ۲۰۰۴ می‌باشند (۳). پیشرفت سریع اپیدمی بیماری‌های قلبی-عروقی، با در نظر گرفتن این که سال‌های از دست رفته از ناتوانی در این بیماری، با افزایشی ۲۹ درصدی از رتبه‌ی

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت و مرکز تحقیقات بازتوانی قلب، پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: awat_feiz@hlth.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر آوات فیضی

آغاز گردید و در حال حاضر نیز بهترین منبع اطلاعات در مورد عوامل خطرزای بیماری‌های قلبی - عروقی می‌باشد (۱۵). از مطالعات مداخلاتی بزرگ در دنیا، می‌توان به مطالعه‌ی Karelia شمالی در کشور فنلاند اشاره کرد. در سال‌های اول دهه‌ی ۱۹۷۰، مردان جوان فنلاندی بالاترین مرگ در اثر بیماری‌های قلبی - عروقی را در جهان داشتند. پس از مطالعه‌ی وسیع در مورد شیوع عوامل خطر ساز در این کشور، در سال ۱۹۷۲ این طرح مداخله‌ای به اجرا درآمد که هدف عمده‌ی آن، تغییر شیوه‌ی زندگی و کنترل عوامل خطر ساز اصلی این بیماری بود (۱۶).

برنامه‌ی قلب سالم اصفهان، یکی از مطالعات مداخلاتی وسیع جامعه‌نگر در ایران است. این برنامه، در سال ۱۳۷۸ طراحی شد و به تصویب سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور رسید و در طی سال‌های ۸۶-۱۳۷۹ به اجرا درآمد. هدف این برنامه، اصلاح شیوه‌ی زندگی مردم و عوامل خطر ساز و همچنین، افزایش آگاهی، نگرش و عملکرد مردم (بالغین، دانش‌آموزان، والدین دانش‌آموزان و برخی معلمان و مسؤولین مدارس)، کارکنان بهداشتی و بیماران قلبی در رابطه با عوامل خطر ساز بیماری‌های قلبی - عروقی و همچنین، راه‌های پیش‌گیری و کنترل از این بیماری‌ها و عوامل خطر آن‌ها است. ساختار اجرایی این برنامه‌ی مداخلاتی و زیر مطالعات این برنامه‌ی بزرگ، به چاپ رسیده است (۱۸-۱۷).

همچنین، تاکنون مقالات متعددی از نتایج این برنامه و زیر مطالعات آن منتشر شده است (۵۴-۱۷، ۱۳-۱۲). این گونه مطالعات مداخله‌ای مبتنی بر جامعه، نه تنها در ایران بلکه در منطقه‌ی مدیترانه‌ی شرقی و خاورمیانه تاکنون انجام نشده است و بدین منظور، توجه به ساختار و طراحی اجرایی آن مهم و ضروری می‌نماید. مقاله‌ی حاضر، با هدف آرایه‌ی گزارشی از روند پیشرفت برنامه‌ی قلب سالم اصفهان با تمرکز بر ساختار نمونه‌گیری و حجم نمونه‌ی این برنامه و زیر مطالعات آن انجام گردید.

روش‌ها

ساختار مطالعاتی، حجم نمونه و روش‌های نمونه‌گیری در برنامه‌ی

قلب سالم اصفهان و زیر مطالعات آن

برنامه‌ی قلب سالم اصفهان، یکی از مطالعات مداخلاتی وسیع جامعه‌نگر در ایران است که در طی سال‌های ۸۶-۱۳۷۹ به اجرا درآمد (۱۸). این برنامه در شهرستان‌های اصفهان و نجف‌آباد (به عنوان مورد) و اراک (به عنوان شاهد) اجرا شد. نواحی مورد بررسی، ناحیه‌های شهری و روستایی شهرستان‌های اصفهان و نجف‌آباد و نواحی شهری و روستایی شهرستان اراک بودند.

هدف: هدف این مطالعه، اصلاح شیوه‌ی زندگی مردم و عوامل خطر ساز بیماری‌ها و همچنین افزایش آگاهی، نگرش و عملکرد مردم

ایسکمیک قلبی، عفونت تنفسی تحتانی و صدمات جاده‌ای، سه دلیل اصلی مرگ و میر بر اساس سال‌های از دست رفته‌ی زندگی در سال ۲۰۱۰ می‌باشند. همچنین، بیشترین بار بیماری از نظر سال‌های از دست رفته از ناتوانی، در این کشورها، بیماری‌های ایسکمیک قلبی، عفونت تنفسی تحتانی، صدمات جاده‌ای و اختلال افسردگی بوده است. در میان ۱۰ مورد از شایع‌ترین علل مرگ و میر در این کشورها، ایران از نظر بیماری‌های ایسکمیک قلبی، وضعیت نامناسب‌تری نسبت به دیگر کشورها دارا می‌باشد (۸). حدود ۵۳ درصد از مرگ‌ها در بالغین ۳۰ سال و بالاتر، ناشی از بیماری‌های قلبی - عروقی (CVD یا Cardiovascular diseases) است که از این میان، ۲۶ درصد به علت بیماری ایسکمیک قلبی، ۱۳ درصد ناشی از سکته‌ی مغزی، ۴ درصد به دلیل فشار خون بالا و ۱۰ درصد ناشی از سایر انواع بیماری‌های قلبی - عروقی بوده است (۹).

درمان این بیماری‌ها، با صرف وقت و هزینه‌ی زیادی همراه است و از آن جا که همواره پیش‌گیری بهتر از درمان است، آرایه‌ی راه‌کارهایی جهت پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی - عروقی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. بر اساس تحقیقات، پیش‌گیری اولیه برای کاهش مرگ ناشی از بیماری‌های قلبی - عروقی می‌تواند چهار بار مؤثرتر از اقدامات پیش‌گیری ثانویه واقع شود و آگاهی در خصوص عوامل خطر، می‌تواند دیدگاهی مناسب برای پیش‌گیری اولیه فراهم آورد (۱۰). یکی از راه‌کارهای مهم در زمینه‌ی پیش‌گیری و کنترل بیماری‌های قلبی - عروقی، آموزش است که می‌تواند در زمینه‌ی پیش‌گیری از عوامل خطر ابتلا، اصلاح سبک زندگی و رفتارهای سالم انجام پذیرد (۱۱). در این راستا، دو راهبردی که می‌بایستی توأم با یکدیگر انجام شوند، شامل مداخلات در سطح عموم مردم و مداخلاتی است که برای افراد در معرض خطر انجام می‌شود (۱۲).

همچنین، لازم است مداخلات در سطح جامعه، از دوران کودکی و حتی قبل از آن انجام شوند تا بتوانند از بروز عوامل خطر و سپس بیماری‌ها در سنین جوانی جلوگیری نمایند (۱۳). علاوه بر آن، نیاز به انجام مطالعاتی در جهت اطلاع از آگاهی، نگرش و عملکرد افراد وجود دارد. نتایج چنین مطالعاتی، می‌تواند کمکی در جهت پیشرفت تکنولوژی برنامه‌های مداخلاتی و آموزش بهداشت در این حوزه باشد (۱۱). بر این اساس، در راستای پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی - عروقی، مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده‌ای در دنیا جهت شناسایی عوامل خطر بیماری‌های قلبی - عروقی و نیز مطالعات مداخله‌ای با هدف کاهش میزان‌های ابتلا و مرگ و میر انجام شده‌اند (۱۴).

مطالعه‌ی قلب Framingham از اولین و بزرگ‌ترین مطالعاتی می‌باشد که در زمینه‌ی شناسایی عوامل خطرزای بیماری‌های قلبی - عروقی در جوامع، صورت پذیرفته است. این مطالعه، در سال ۱۹۴۸

تصادفی اما مستقل از نمونه‌های مراحل اول و دوم و برای تعیین تأثیر مداخلات بر روی تمام گروه‌های هدف انجام شد.

در ادامه، به تفصیل جوامع هدف، حجم نمونه، فرایندهای نمونه‌گیری، پرسش‌نامه‌ها و متغیرهای مورد ارزیابی هر کدام از چهار گروه هدف شرح داده می‌شود.

۱- مطالعه‌ی گروه بالغین

جامعه‌ی هدف: بالغین ۱۹ سال به بالا

حجم نمونه و فرایند نمونه‌گیری: در گروه بالغین، نمونه‌گیری مرکب انجام شده است. ابتدا سهمیه‌ی نمونه‌گیری جمعیت اصفهان به نجف‌آباد دو سوم به یک سوم در نظر گرفته شده است. سپس، طبقات نمونه‌گیری بر اساس توزیع سنی، جنسی و همچنین شهری و روستایی مناطق، مشخص شده و تعداد نمونه‌ها در گروه‌های سنی ۲۴-۱۹، ۳۴-۲۵، ۴۴-۳۵، ۵۴-۴۵، ۶۴-۵۵ و ۶۵ سال به بالا و بر اساس توزیع سنی جمعیت تعیین گردید. در مطالعات ارزشیابی در سال‌های ۸۵-۱۳۸۱، مشابه روش MONICA (Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease)، تعداد مساوی در هر گروه سنی در نظر گرفته شد. همچنین، با توجه به تساوی توزیع جنسیتی جمعیت در ایران، تعداد زنان و مردان مساوی در نظر گرفته شد. به علاوه، تعداد نمونه‌ی مناطق شهری و روستایی هر شهرستان، بر اساس توزیع جمعیتی آن تخصیص گردید.

در مرحله‌ی بعد، نمونه‌گیری خوشه‌ای چند مرحله‌ای بر اساس خوشه‌های مرکز بهداشت استان انجام شد. در همین راستا، خوشه‌های هر یک از مناطق شهری و روستایی اصفهان، نجف‌آباد و اراک از بین مراکز بهداشتی به تصادف انتخاب شدند. سپس به هر خوشه، متناسب با تعداد خانواده‌های تحت پوشش آن، نمونه تخصیص گردید.

در مرحله‌ی بعد، با استفاده از روش نمونه‌گیری سیستماتیک، خانوارهای موجود در هر خوشه انتخاب و به تصادف برای یک فرد بالای ۱۹ سال در آن خانوار، پرسش‌نامه تکمیل شد. بر اساس فرمول برآورد نسبت‌ها در دو گروه و با لحاظ $P_1 = 0/20$ ، $P_2 = 0/15$ ، $d = 0/05$ و $B = 0/10$ و با در نظر گرفتن نسبت مساوی در دو جنس و دقت نمونه‌گیری خوشه‌ای و در نهایت در نظر گرفتن ریزش احتمالی، در دو جامعه (مورد و شاهد) در مراحل اول و سوم به ترتیب ۱۲۵۱۴ و ۹۵۷۲ نفر نمونه‌گیری شدند و اطلاعات پرسش‌نامه‌ای آن‌ها در دسترس می‌باشد (۱۷-۱۸).

حجم کل نمونه و جزییات نمونه‌گیری در دیگر مراحل این مطالعه، در جدول ۱ و همچنین توزیع حجم نمونه‌ی بررسی شده در ساختار مطالعاتی بالغین بر اساس مواردی که در نمونه‌گیری دخیل بوده‌اند، در جدول ۲ آمده است.

(بالغین، دانش‌آموزان، والدین دانش‌آموزان و برخی معلمان و مسئولین مدارس)، کارکنان بهداشتی و بیماران قلبی در رابطه با عوامل خطر ساز بیماری‌های قلبی-عروقی و همچنین، راه‌های پیش‌گیری و کنترل این بیماری‌ها و عوامل خطر آن‌ها بود.

فرایند اجرا: این برنامه مشتمل بر سه مرحله‌ی بررسی وضعیت موجود در نواحی مورد و شاهد، اجرای مداخله‌ها در ناحیه‌ی مورد و بررسی وضعیت بعد از مداخله در نواحی مورد و شاهد بود.

مرحله‌ی اول: بررسی وضعیت موجود در نواحی مورد و شاهد در

سال‌های ۱۳۷۹-۸۰

اهداف و جوامع هدف: بررسی مقطعی در مورد وضعیت فعلی جامعه در رابطه با آگاهی، نگرش و عملکرد در زمینه‌ی تغذیه، سیگار، فعالیت فیزیکی و بیماری‌های قلبی-عروقی و همچنین، بررسی وضعیت عوامل خطر ساز قلبی شامل انواع چربی خون بالا، پرفشاری خون، دیابت، چاقی، شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی و مرگ و میر ناشی از این بیماری‌ها در قالب چهار مطالعه‌ی مقطعی ۱- بالغین، ۲- کارکنان بهداشتی (شامل بهورز، کاردان، کارشناس، رابط بهداشتی، پزشکان دولتی و خصوصی)، ۳- دانش‌آموزان ۱۸-۱۱ ساله در مقاطع راهنمایی و دبیرستان، والدین آن‌ها و برخی معلمان و مسئولین مدارس و ۴- بیماران مبتلا به بیماری‌های قلبی پی‌گیری گردید. شهرستان‌های اصفهان و نجف‌آباد به عنوان نواحی مورد و اراک به عنوان ناحیه‌ی شاهد در نظر گرفته شد.

مرحله‌ی دوم: اجرای مداخله‌ها در ناحیه‌ی مورد در سال‌های

۸۵-۱۳۸۱

اهداف و جوامع هدف: برنامه‌ی قلب سالم اصفهان، شامل انواع مداخلاتی بود که در قالب ۱۰ طرح مداخلاتی مختلف بر حسب گروه‌های هدف، به مدت ۴ سال با تکیه بر تغذیه‌ی صحیح، مبارزه با دخانیات، ورزش و فعالیت فیزیکی و نحوه‌ی مقابله با استرس‌ها بر روی آحاد جامعه در شهرستان‌های مورد (اصفهان و نجف‌آباد) به اجرا درآمده است. همچنین، سالیانه یک مطالعه‌ی مقطعی در شهرستان‌های مورد و شاهد برای ارزیابی نتایج زودرس مطالعه جهت تعیین روند تغییر شاخص‌ها، در نمونه‌های مستقل و تصادفی از هر کدام از گروه‌های هدف شامل بالغین، دانش‌آموزان، والدین، برخی معلمان و مسئولین مدارس برای ۴ بار و گروه‌های کارکنان بهداشتی و بیماران مبتلا به بیماری‌های قلبی، برای ۲ بار انجام گرفت. علاوه بر همه‌ی گروه‌های هدف یاد شده در این برنامه، نمونه‌هایی تصادفی از والدین کودکان ۱۰-۲ ساله‌ی پیش‌دبستانی و دبستانی نیز از این مرحله به بعد بررسی شدند.

مرحله‌ی سوم: بررسی وضعیت بعد از مداخله در نواحی مورد و

شاهد در سال‌های ۸۷-۱۳۸۶

اهداف و جوامع هدف: مشابه مرحله‌ی اول، مطالعه‌ای روی نمونه‌های

جدول ۱. ساختار مطالعاتی، حجم نمونه و روش‌های نمونه‌گیری در برنامه‌ی قلب سالم اصفهان و زیر مطالعات آن

گروه هدف	تعریف گروه هدف	مرحله‌ی اول (ارزیابی اولیه) ۱۳۷۹-۸۰			مرحله‌ی دوم (ارزیابی‌های سالیانه) ۱۳۸۱-۸۵			مرحله‌ی سوم (ارزیابی نهایی) ۱۳۸۶-۸۷		
		روش‌های نمونه‌گیری	حجم نمونه	جزئیات	روش‌های نمونه‌گیری	حجم نمونه	جزئیات	روش‌های نمونه‌گیری	حجم نمونه	جزئیات
بالغین	افراد بالغ در دو ناحیه‌ی مورد و شاهد	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، سیستماتیک، تصادفی ساده	۱۲۵۱۴	نمونه‌گیری بر اساس توزیع سنی، جنسی و شهر و روستا در جامعه	۵۸۹۱	- نمونه‌گیری بر اساس توزیع جنسی و شهر و روستا در جامعه	۹۵۷۲	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، سیستماتیک و تصادفی ساده	نمونه‌گیری بر اساس توزیع سنی، جنسی و شهر و روستا در جامعه	
			۱۹۴۶	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۱۹۹۹	- نمونه‌گیری بر اساس توزیع جنسی و شهر و روستا در جامعه	۱۹۹۲	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	نمونه‌گیری بر اساس توزیع جنسی، شهر و روستا و مقطع تحصیلی در جامعه	
			۰	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۱۹۹۸	- نمونه‌گیری بر اساس توزیع جنسی و شهر و روستا در جامعه	۱۹۱۴	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	نمونه‌گیری بر اساس توزیع جنسی، شهر و روستا و مقطع تحصیلی در جامعه	
والدین کودکان	کودکان مهدهای کودک، مراکز پیش‌دبستانی و دبستان در دو ناحیه‌ی مورد و شاهد	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۱۹۴۶	-	۱۹۹۹	- سال چهارم در این مرحله فقط در ناحیه‌ی مورد انجام شده است.	۱۹۸۴	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	-	
			۳۹۸	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی ساده	۲۰۱	- سال چهارم در این مرحله فقط در ناحیه‌ی مورد انجام شده است.	۴۲۵	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی ساده	-	
			۱۱۶۳	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۳۴۲					
والدین دانش‌آموزان	والدین دانش‌آموزان مقاطع راهنمایی، دبیرستان و هنرستان در دو ناحیه‌ی مورد و شاهد	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۱۳۰۳	مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۱۳۰۳					
			۱۱۶۳	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۱۱۶۳					
			۳۴۲	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۳۴۲					
معلمین و مسئولین	معلمین و مسئولین مقاطع پیش‌دبستان، دبستان، راهنمایی، دبیرستان و هنرستان در دو ناحیه‌ی مورد و شاهد	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی ساده	۳۹۸	-	۲۰۱	- سال چهارم در این مرحله فقط در ناحیه‌ی مورد انجام شده است.	۴۲۵	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی ساده	-	
			۳۹۸	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی ساده	۳۲۷					
			۱۱۶۳	نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای به ترتیب، سهمیه‌ای، طبقه‌ای، خوشه‌ای، تصادفی، متناسب با حجم، تصادفی ساده	۱۱۶۳					

جدول ۱. ساختار مطالعاتی، حجم نمونه و روش‌های نمونه‌گیری در برنامه‌ی قلب سالم اصفهان و زیر مطالعات آن (۱۳۸۵)

گروه هدف	تعریف گروه هدف	چارچوب نمونه‌گیری	مرحله‌ی اول (ارزیابی اولیه) ۱۳۷۹-۸۰			مرحله‌ی دوم (ارزیابی‌های سالیانه) ۱۳۸۱-۸۵			مرحله‌ی سوم (ارزیابی نهایی) ۱۳۸۶-۸۷		
			روش‌های نمونه‌گیری	حجم نمونه	جزئیات	روش‌های نمونه‌گیری	حجم نمونه	جزئیات	روش‌های نمونه‌گیری	حجم نمونه	جزئیات
پرسنل بهداشتی	بهورز، کاردان، کارشناس، رابط بهداشتی و بهداشتی و پزشک عمومی و متخصص (دولتی و خصوصی)	کارکنان نظام سلامت در مراکز بهداشت و بیمارستان‌ها در دو ناحیه‌ی مورد و شاهد	نمونه‌گیری تصادفی	۹۲۳	-	نمونه‌گیری تصادفی	۶۹۴	-	نمونه‌گیری تصادفی	۲۰۱۵	-
						۱۰۰۰					
بیماران قلبی	بیماران قلبی	بیماران استخراج شده از لیست‌های واحد ثبت سکنه‌ها در مرکز تحقیقات قلب و عروق در دو ناحیه‌ی مورد و شاهد	نمونه‌گیری تصادفی	۸۱۴	-	نمونه‌گیری تصادفی	۴۵۲	-	نمونه‌گیری تصادفی	۵۰۲	-
						۴۲۰					

MONICA: Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease

جدول ۲. توزیع حجم نمونه‌ی بررسی شده در زیر مطالعه‌ی بالغین برنامه‌ی قلب سالم اصفهان

مرحله‌ی سوم (ارزیابی نهایی)	مرحله‌ی دوم (ارزیابی‌های سالیانه)		مرحله‌ی اول (ارزیابی اولیه)		مطالعه‌ی بالغین			
	۱۳۸۶-۸۷	۱۳۸۵	۱۳۸۴	۱۳۸۳		۱۳۸۱-۸۲	۱۳۷۹-۸۰	
	(۴۷۱۹ (۴۹/۳)	۳۰۱۲ (۱۰۰/۰)	۳۰۱۴ (۴۹/۴)	۲۴۰۰ (۵۰/۱)	۲۹۹۴ (۵۰/۸)	۶۱۷۵ (۴۹/۳)	مورد	نواحی
	۴۸۵۳ (۵۰/۷)	۰(۰)	۳۰۸۲ (۵۰/۶)	۲۳۹۳ (۴۹/۹)	۲۸۹۷ (۴۹/۲)	۶۳۳۹ (۵۰/۷)	شاهد	
	۶۶۹۲ (۶۹/۹)	۲۶۵۲ (۸۸/۰)	۴۵۲۱ (۷۴/۲)	۳۵۰۶ (۷۳/۱)	۴۳۷۰ (۷۴/۲)	۹۰۹۳ (۷۲/۷)	شهری	منطقه
	۲۸۰ (۳۰/۱)	۳۶۰ (۱۲/۰)	۱۵۷۵ (۲۵/۸)	۱۲۸۷ (۲۶/۹)	۱۵۲۱ (۲۵/۸)	۳۴۲۱ (۲۷/۳)	روستایی	
	۴۷۸۶(۵۰/۰)	۱۵۵۸ (۵۱/۷)	۳۱۱۲ (۵۱/۲)	۲۴۲۴ (۵۰/۶)	۲۹۹۳ (۵۰/۸)	۶۳۹۱ (۵۱/۱)	زن	جنس
	۴۷۸۶(۵۰/۰)	۱۴۵۳ (۴۸/۳)	۲۹۷۱ (۴۸/۸)	۲۳۶۹ (۴۹/۴)	۲۸۹۸ (۴۹/۲)	۶۱۲۳ (۴۸/۹)	مرد	
	۱۸۸۶(۱۹/۷)	۴۲۷ (۱۴/۲)	۹۷۱ (۱۶/۰)	۹۶۷ (۲۰/۲)	۱۱۷۵ (۱۹/۹)	۲۳۱۰ (۱۸/۵)	سال ۱۹-۲۴	گروه‌های سنی
	۲۹۱۳ (۳۰/۵)	۵۴۰ (۱۷/۹)	۱۰۴۲ (۱۷/۱)	۹۶۹ (۲۰/۲)	۱۲۰۲ (۲۰/۴)	۳۶۶۲ (۲۹/۳)	سال ۲۵-۳۴	
	۱۸۹۸ (۱۹/۸)	۵۱۲ (۱۷/۰)	۱۰۲۵ (۱۶/۹)	۹۵۸ (۲۰/۰)	۱۲۰۱ (۲۰/۴)	۲۷۱۷ (۲۱/۷)	سال ۳۵-۴۴	
	۱۱۷۴ (۱۲/۳)	۵۰۹ (۱۶/۹)	۱۰۳۰ (۱۶/۹)	۹۴۶ (۱۹/۷)	۱۱۳۷ (۱۹/۳)	۱۶۲۸ (۱۳/۰)	سال ۴۵-۵۴	
	۷۵۷ (۷/۹)	۴۹۲ (۱۶/۳)	۹۸۶ (۱۶/۲)	۵۰۱ (۱۰/۵)	۶۷۱ (۱۱/۴)	۱۱۳۰ (۹/۰)	سال ۵۵-۶۴	
	۹۳۷ (۹/۸)	۵۳۰ (۱۷/۶)	۱۰۲۹ (۱۶/۹)	۴۵۲ (۹/۴)	۵۰۵ (۸/۶)	۱۰۶۷ (۸/۵)	سال ۶۵ و بالاتر	

۱۳۸۶-۸۷ منتشر و گزارش شده است (۵۲). نسخه‌ی جدید نمودار

این طرح تا سال ۱۳۹۰ در شکل ۱ آمده است.

متغیرهای مورد ارزیابی: در مطالعه‌ی بالغین برنامه‌ی قلب سالم

اصفهان، پرسش‌نامه‌ها بر اساس The WHO Stepwise approach

(STEPS) و اندازه‌گیری‌ها بر اساس استانداردهای سازمان جهانی

بهداشت طراحی شده است. در بعضی قسمت‌های پرسش‌نامه، علاوه

بر حفظ ساختار STEPS، سؤالات و پرسش‌های اضافه‌تری نیز برای

افراد تکمیل گردیده است. به طور کلی، پرسش‌نامه‌ها مشتمل بر

۴ قسمت می‌باشند: قسمت اول، اطلاعات دموگرافیک افراد (نظیر

سن، جنس، میزان تحصیلات، شغل و وضعیت تأهل) و وضعیت

اقتصادی- اجتماعی؛ قسمت دوم، سؤالات مربوط به آگاهی،

نگرش و عملکرد در زمینه‌ی تغذیه، سیگار، بیماری‌های قلبی-

عروقی و فعالیت فیزیکی که میزان آگاهی و نگرش مردم را در

مورد عوامل خطر ساز قلبی و همچنین عملکرد و شیوه‌ی زندگی

افراد را در این موارد می‌سنجد (۱۷-۱۸).

برای تعیین عملکرد تغذیه‌ای افراد، از پرسش‌نامه‌ی استاندارد

تکرر مصرف مواد غذایی با روایی و پایایی مناسب استفاده شده

است (۵۱). قسمت سوم، سؤالات مربوط به استرس، راه‌های مقابله با

آن و کیفیت زندگی و قسمت چهارم نیز در رابطه با شرح حال و

انجام معاینات بالینی و پاراکلینیکی شامل سؤالاتی در زمینه‌ی سابقه‌ی

عوامل خطر ساز قلبی نظیر دیابت، پرفشاری خون، چربی خون بالا و

سابقه‌ی فامیلی بیماری‌های قلبی بود. همچنین، برای افراد بالاتر از ۳۵

سال، پرسش‌نامه استاندارد Rose (Rose Angina Questionnaire)

افراد بالای ۳۵ سال مرحله‌ی اول مطالعه‌ی بالغین برنامه‌ی قلب

سالم اصفهان در سال‌های ۱۳۷۹-۸۰، که ۶۵۰۴ نفر بودند، برای

شرکت در یک مطالعه‌ی طولی به نام مطالعه‌ی Cohort اصفهان (ICS

یا Isfahan cohort study) انتخاب شدند. هدف از این مطالعه،

تعیین تأثیرات فردی و ترکیبی عوامل خطر مختلف روی بروز

حوادث حاد کشنده و غیر کشنده‌ی عروق کرونر و سکنه‌های مغزی

بوه است. این افراد، هر دو سال یک بار پی‌گیری تلفنی شده‌اند.

عوارض ایجاد شده از جمله سکنه‌ی قلبی و مغزی کشنده و غیر

کشنده، آئزین پایدار و ناپایدار و مرگ ناگهانی که در مصاحبه‌ی تلفنی

عنوان گردیده است، به عنوان حوادث قلبی و عروقی مستندسازی

شده بر اساس اطلاعات واحد ثبت بیماری‌های مرکز تحقیقات قلب و

عروق اصفهان جمع‌آوری می‌شود که نیازمند تطبیق سیستم کدگذاری

انجام شده در ابتدای مطالعه با سیستم واحد ثبت بیماری‌ها می‌باشد.

بر اساس اطلاعات جمع‌آوری شده در واحد ثبت سکنه‌های قلبی

و مغزی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، موارد غیر طبیعی یا

مواردی که در بانک داده‌های طرح موجود نباشد، از طریق مراجعه‌ی

حضور به مدارک بیمارستانی با کمک کارشناسان این واحد دوباره

بررسی شده است. سپس، با بررسی پرونده‌ی بیماران توسط جمعی از

متخصصان شامل متخصصان قلب و عروق و مغز و اعصاب، در مورد

حوادث قلبی- عروقی و مغزی بیمار تصمیم نهایی اتخاذ شده است.

روش‌های نمونه‌گیری در این مطالعه، به طور کامل مشابه با مطالعه‌ی

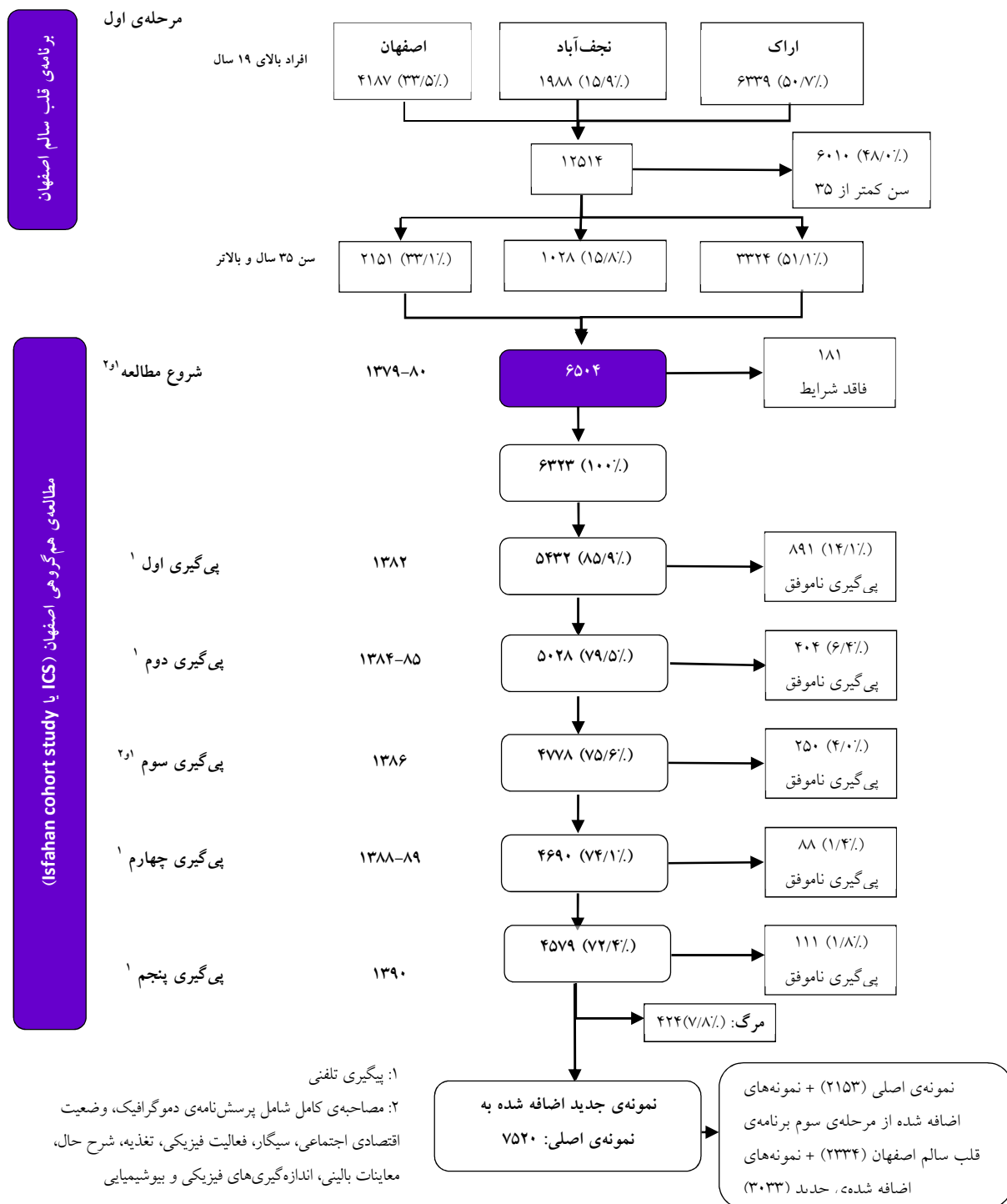
بالغین بود. جزئیات پی‌گیری‌های تلفنی و مصاحبه‌ای و همچنین،

تعداد افراد مورد پی‌گیری مطالعه‌ی هم‌گروهی اصفهان تا سال‌های

برای تشخیص دردهای آنژیینی و کدهای Minnesota استاندارد شده برای آنالیز الکتروکاردیوگرام افراد به منظور مشخص کردن کیفیت دردهای قلبی استفاده شد.

همچنین، شاخص‌های وزن، قد، دور کمر و لگن، فشار خون سیستولیک و دیاستولیک، کلسترول تام، Low-density lipoprotein

(LDL)، High-density lipoprotein (HDL)، آپولیپوپروتئین A و B، تری‌گلیسرید، قند خون ناشتا و دو ساعته، CBC (Complete Blood Count)، C-reactive protein (CRP) نیز در گروه بالغین اندازه‌گیری شده است. در مطالعه‌ی بالغین، قسمت‌های اول تا سوم پرسش‌نامه در هر سه مرحله‌ی اول تا سوم تکمیل شده است. در



شکل ۱. مطالعه‌ی Cohort اصفهان (ICS یا Isfahan Cohort Study)

متغیرهای مورد ارزیابی: برای جمع‌آوری اطلاعات گروه کودکان و نوجوانان و با توجه به متنوع بودن گروه‌های مورد بررسی، چهار نوع پرسش‌نامه به تفکیک برای والدین کودکان پیش‌دبستانی و دبستانی، دانش‌آموزان راهنمایی و دبیرستان، والدین دانش‌آموزان راهنمایی و دبیرستان و نیز مسؤولین و معلمان مدارس، طراحی گردیده است. پس از کسب رضایت کتبی از والدین کودکان و نوجوانان، پرسش‌نامه‌ی حاوی سؤالات دموگرافیک، آگاهی، نگرش و عملکرد در مورد عوامل خطر، اهمیت و نحوه‌ی کنترل و پیش‌گیری این عوامل خطر از دوران کودکی، سپس سؤالات اختصاصی در مورد تکرر مصرف مواد غذایی برای همه‌ی کودکان و نوجوانان تکمیل شده است. اندازه‌گیری وزن، قد، دور کمر و لگن، فشار خون سیستولیک و دیاستولیک، کلسترول تام، HDL، LDL، تری‌گلیسرید و قند خون ناشتا نیز در مراحل اول و سوم و همچنین، آپولیپوپروتئین A و B، در مرحله‌ی سوم، در دانش‌آموزان ۱۸-۱۱ سال به عمل آمد (۵۳، ۴۷، ۴۴، ۴۲، ۳۹، ۱۹-۱۷، ۱۳).

۳- مطالعه‌ی گروه پرسنل بهداشتی

جامعه‌ی هدف: پرسنل بهداشتی شامل بهورز، کاردان، کارشناس، رابط بهداشتی و پزشک عمومی و متخصص (دولتی و خصوصی)
حجم نمونه و فرایند نمونه‌گیری: با نمونه‌گیری به روش تصادفی ساده از بین کارکنان نظام سلامت در سطوح کاردانی - کارشناسی، دکترای عمومی، حجم نمونه برای مراحل اول و سوم به ترتیب ۹۲۳ و ۲۰۱۵ نفر برای هر دو ناحیه‌ی مورد و شاهد برآورد و نمونه‌گیری انجام شده است.
متغیرهای مورد ارزیابی: برای جمع‌آوری اطلاعات این گروه از پرسش‌نامه‌های اختصاصی برای پزشکان با حداکثر ۵۰ سؤال، پرستاران با ۴۰ سؤال، کاردانان بهداشتی و بهورزان با ۵۰ سؤال استفاده شده است. پرسش‌نامه‌ها، حاوی سؤالاتی در مورد آگاهی، نگرش و عملکرد پرسنل بهداشتی در مورد تغذیه‌ی صحیح، ترک دخانیات، فعالیت فیزیکی، عوامل خطر، نحوه‌ی پیش‌گیری و کنترل بیماری‌های قلبی-عروقی، راه‌های درمان دارویی و غیر دارویی بیماری‌ها، می‌باشد (۴۹، ۲۳، ۱۸-۱۷). حجم کل نمونه و جزییات نمونه‌گیری همه‌ی مراحل برنامه‌ی قلب سالم اصفهان در گروه هدف یاد شده در جدول ۱ و همچنین، توزیع حجم نمونه‌ی بررسی شده در ساختار مطالعاتی آن‌ها، بر اساس موارد دخیل در نمونه‌گیری، در جدول ۴ آمده است.

۴- مطالعه‌ی گروه بیماران

جامعه‌ی هدف: هدف این بخش از مطالعه، بیماران با سابقه‌ی سکته‌ی قلبی، بیماران با سابقه‌ی سکته‌ی مغزی یا حملات گذرای ایسکمیک مغزی، بیماران با سابقه‌ی تست ورزش مثبت یا آنژیوگرافی مثبت، بیماران با سابقه‌ی CABG (Coronary artery bypass grafting) یا PTCA (Percutaneous transluminal coronary angioplasty)، بیماران با سابقه‌ی بستری به علت حملات قلبی جامعه‌ی بودند.

حالی که، قسمت چهارم پرسش‌نامه که شامل اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی، معاینات و شرح حال افراد است، فقط در مراحل اول و سوم برنامه پرسیده شده است (۱۸-۱۷).

۲- مطالعه‌ی گروه کودکان، نوجوانان، والدین، معلمان و مسؤولین مدارس

جامعه‌ی هدف: والدین کودکان ۱۰-۲ ساله‌ی پیش‌دبستانی و دبستانی، دانش‌آموزان ۱۸-۱۱ ساله‌ی مقاطع راهنمایی و دبیرستان، والدین دانش‌آموزان و برخی معلمان و مسؤولین مدارس

حجم نمونه و فرایند نمونه‌گیری: روش نمونه‌گیری مرکب چند مرحله‌ای از میان مهدهای کودک، مراکز پیش‌دبستانی و دبستان‌ها، مدارس راهنمایی، دبیرستان و هنرستان گزارش شده توسط آموزش و پرورش بر اساس مناطق شهری و روستایی اصفهان، نجف‌آباد و اراک به صورت زیر انجام شده است:

- ۱- تعیین سهمیه‌ی نمونه‌گیری جمعیت اصفهان به نجف‌آباد (دو سوم به یک سوم)
- ۲- تعیین طبقات نمونه‌گیری بر اساس توزیع جنسی، مقطع تحصیلی و همچنین شهری و روستایی مناطق مختلف بر اساس توزیع جمعیتی آن
- ۳- تعیین تصادفی خوشه‌ها (مدارس) از مناطق شهری و روستایی مناطق مورد و شاهد
- ۴- تخصیص جمعیت مورد نمونه‌گیری به هر مدرسه، با احتمال متناسب با حجم آن مدرسه
- ۵- انتخاب تصادفی کلاس‌های هر مدرسه و همچنین انتخاب تصادفی دانش‌آموزان درون این کلاس‌ها

با توجه به فرمول برآورد نسبت‌ها و با لحاظ دقت نمونه‌گیری معادل ۱۰ درصد، حداقل نسبت مورد سنجش ۰/۳ و خطای ۵ درصد، حجم نمونه به ترتیب در مراحل اول و سوم (در کل مناطق مورد و شاهد) معادل ۱۹۴۶ و ۱۹۹۲ دانش‌آموز ۱۸-۱۱ سال، ۱۹۴۶ و ۱۹۸۴ نفر والدین این دانش‌آموزان و ۳۹۸ و ۴۲۵ نفر مسؤولین مدارس شامل مدیر، ناظم، مراقب بهداشت، مشاور مدرسه، دبیر پرورشی، دبیر ورزش و دبیر زیست‌شناسی (یا علوم) برآورد و نمونه‌گیری شده است. علاوه بر همه‌ی نمونه‌های یاد شده، در مراحل دوم و سوم این مطالعه، نمونه‌هایی تصادفی از کودکان ۱۰-۲ ساله‌ی پیش‌دبستانی و دبستانی به همراه یکی از والدین آن‌ها نیز انجام شده است. حجم کل نمونه و جزییات نمونه‌گیری همه‌ی مراحل برنامه‌ی قلب سالم اصفهان در گروه‌های هدف پیش‌گفته در جدول ۱ و همچنین توزیع حجم نمونه‌ی بررسی شده در ساختار مطالعاتی آن‌ها، بر اساس مواردی که در نمونه‌گیری دخیل بوده‌اند، در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳. توزیع حجم نمونه‌ی بررسی شده در زیر مطالعات دانش‌آموزان، کودکان و معلمان برنامه‌ی قلب سالم اصفهان

مرحله‌ی سوم (ارزیابی نهایی)	مرحله‌ی دوم (ارزیابی‌های سالیانه)				مرحله‌ی اول (ارزیابی اولیه)				
	۱۳۸۶-۸۷	۱۳۸۵	۱۳۸۴	۱۳۸۳	۱۳۸۱-۸۲	۱۳۷۹-۸۰			
۹۷۲ (۴۸/۸)	۳۸۹ (۱۰۰/۰)	۵۱۶ (۴۲/۲)	۶۲۹ (۴۴/۱)	۱۰۰۰ (۵۰/۰۳)	۹۶۹ (۴۹/۸)	مورد	نواحی	دانش‌آموزان	
۱۰۲۰ (۵۱/۲)	۰ (۰)	۷۰۷ (۵۷/۸)	۷۹۸ (۵۵/۹)	۹۹۹ (۴۹/۹)	۹۷۷ (۵۰/۲)	شاهد		۱۱-۱۸ سال	
۱۵۳۲ (۷۶/۹)	۳۲۱ (۸۲/۵)	۸۳۷ (۶۸/۴)	۱۰۸۵ (۷۶/۰)	۱۳۲۰ (۶۶/۰)	۱۲۵۱ (۶۴/۳)	شهری	منطقه		
۴۶۰ (۲۳/۱)	۶۸ (۱۷/۵)	۳۸۶ (۳۱/۶)	۳۴۲ (۲۴/۰)	۶۷۹ (۳۴/۰)	۶۹۵ (۳۵/۷)	روستایی			
۹۷۸ (۴۹/۱)	۱۹۳ (۵۴/۸)	۶۵۸ (۵۷/۷)	۷۳۲ (۵۱/۷)	۹۹۹ (۴۹/۹)	۱۰۰۱ (۵۱/۴)	دختر	جنس		
۱۰۱۴ (۵۰/۹)	۱۵۹ (۴۵/۲)	۴۸۲ (۴۲/۳)	۶۸۳ (۴۸/۳)	۱۰۰۰ (۵۰/۰)	۹۴۵ (۴۸/۶)	پسر			
۱۰۳۹ (۵۲/۲)	۲۰۳ (۵۲/۲)	۶۱۸ (۵۰/۵)	۷۷۴ (۵۴/۷)	۱۰۰۰ (۵۰/۰)	۹۸۶ (۵۰/۷)	راهنمایی	مقطع		
۹۵۳ (۴۷/۸)	۱۸۶ (۴۷/۸)	۶۰۵ (۴۹/۵)	۶۶۱ (۴۵/۳)	۹۹۹ (۴۹/۹)	۹۶۰ (۴۹/۳)	دبیرستان و هنرستان	تحصیلی		
۹۷۲ (۵۰/۸)	۴۳۱ (۱۰۰/۰)	۵۸۴ (۳۷/۹)	۶۷۱ (۳۸/۳)	۱۰۰۰ (۵۰/۱)	۰ (۰)	مورد	نواحی	والدین	
۹۴۲ (۴۹/۲)	۰ (۰)	۹۵۸ (۶۲/۱)	۱۰۸۳ (۶۱/۷)	۹۹۸ (۴۹/۹)		شاهد		کودکان	
۱۴۷۵ (۷۷/۱)	۳۹۹ (۹۲/۶)	۱۲۰۶ (۷۸/۲)	۱۴۷۷ (۸۴/۲)	۱۹۹۸ (۱۰۰)		شهری	منطقه	۱۰-۲ سال	
۴۳۹ (۲۲/۹)	۳۲ (۷/۴)	۳۳۶ (۲۱/۸)	۲۷۷ (۱۵/۸)			روستایی			
۹۳۳ (۴۸/۷)	۱۹۴ (۴۵/۸)	۷۷۴ (۵۱/۱)	۹۱۹ (۵۲/۶)	۹۹۸ (۴۹/۹)		دختر	جنس		
۹۸۱ (۵۱/۳)	۲۳۰ (۵۴/۲)	۷۴۰ (۴۸/۹)	۸۲۹ (۴۷/۴)	۱۰۰۰ (۵۰/۱)		پسر			
۹۲۲ (۴۸/۲)	۱۵۵ (۳۶/۰)	۶۴۹ (۴۲/۱)	۸۳۱ (۴۷/۵)	۹۸۷ (۴۹/۷)		پیش‌دبستان	مقطع		
۹۸۹ (۵۱/۸)	۲۷۵ (۶۴/۰)	۸۹۲ (۵۷/۹)	۹۲۰ (۵۲/۵)	۱۰۰۰ (۵۰/۳)		دبستان	تحصیلی		
۱۹۳ (۴۵/۴)	۱۸۱ (۱۰۰)	۳۰۶ (۷۰/۲)	۲۰۹ (۶۳/۹)	۲۰۰ (۱۰۰)	۲۰۱ (۵۰/۵)	مورد	نواحی	معلمان و	
۲۳۲ (۵۴/۶)	۰ (۰)	۱۳۰ (۲۹/۸)	۱۱۸ (۳۶/۱)	۰ (۰)	۱۹۷ (۴۹/۵)	شاهد		مسئولین	
۶۴ (۱۵/۱)	۲۳ (۱۵/۱)	۵۳ (۱۴/۲)	۳۰ (۹/۲)	۲۰۱ (۱۰۰)	۳۹۸ (۱۰۰)	مدیر		مدارس	
۷۲ (۱۶/۹)	۳۶ (۲۳/۷)	۵۵ (۱۴/۷)	۵۳ (۱۶/۲)			ناظم			
۵۱ (۱۲/۰)	۲۰ (۱۳/۲)	۴۲ (۱۱/۲)	۱۰ (۳/۱)			دبیر پرورشی یا مشاور			
۱۴ (۳/۳)	۵ (۳/۳)	۱۷ (۴/۵)	۹ (۲/۸)			دبیر زیست‌شناسی			
۱۶ (۳/۸)	۱۱ (۷/۲)	۲۶ (۷/۰)	۲۱۶ (۶۶/۱)			دبیر ورزش			
۵ (۱/۲)	۲ (۱/۳)	۱۳ (۳/۵)	۳ (۰/۹)			مراقب بهداشت			
۱۹۲ (۴۵/۲)	۵۵ (۳۶/۲)	۱۶۸ (۴۹/۹)	۶ (۱/۸)			سایر موارد			

نگرش و عملکرد، اندازه‌گیری قد، وزن، فشار خون سیستولیک و دیاستولیک، کلسترول تام، HDL، LDL، تری‌گلیسرید، قند خون ناشتا، آپولیپوپروتئین A و B و CRP و همچنین پرسش‌نامه‌ای شامل تعداد مراجعات به پزشک، بستری مجدد، داروها، اعمال تشخیصی، روزهای مرخصی و از کار افتادگی، جراحی قلب باز و آنژیوپلاستی که به صورت استاندارد تهیه شده بود، برای بیماران قلبی و مغزی تکمیل شده است (۳۲، ۱۸-۱۷).

حجم کل نمونه و جزئیات نمونه‌گیری همه‌ی مراحل برنامه‌ی قلب سالم اصفهان در گروه هدف یاد شده در جدول ۱ و همچنین، توزیع حجم نمونه‌ی بررسی شده در ساختار مطالعاتی آن، بر اساس موارد دخیل در نمونه‌گیری، در جدول ۴ آمده است.

حجم نمونه و فرایند نمونه‌گیری: در این مطالعه، نمونه‌گیری به روش تصادفی از بین مراجعه‌کنندگان به مراکز درمانی خصوصی و دولتی (عمومی و تخصصی) و همچنین بیماران استخراج شده از لیست ۱۸-۶ ماه قبل واحد ثبت سکتها در اصفهان و پرونده‌های بیمارستانی شهرستان نجف‌آباد و اراک انجام شده است.

بر اساس فرمول برآورد نسبت‌ها و با لحاظ دقت معادل ۱۰ درصد، حداقل نسبت مورد سنجش ۰/۳ و خطای ۵ درصد، حجم نمونه برای مراحل اول و دوم به ترتیب معادل ۸۱۴ و ۵۰۲ نمونه در مجموع برای هر دو ناحیه‌ی مورد و شاهد، برآورد و نمونه‌گیری انجام شده است.

متغیرهای مورد ارزیابی: در این مطالعه، پرسش‌نامه‌ی آگاهی،

جدول ۴. توزیع حجم نمونه‌ی بررسی شده در زیر مطالعات پرستل بهداشتی و بیماران قلبی - عروقی برنامه‌ی قلب سالم اصفهان

مرحله‌ی سوم (ارزیابی نهایی)	مرحله‌ی دوم (ارزیابی‌های سالیانه)		مرحله‌ی اول (ارزیابی اولیه)		بیماران قلبی - عروقی	نواحی	مورد
	۱۳۸۶-۸۷	۱۳۸۵	۱۳۸۴	۱۳۸۳			
۲۵۰ (۴۹/۸)	۲۴۹ (۵۹/۳)	۲۵۲ (۵۵/۸)	۰ (۰)	۰ (۰)	۲۶۹ (۳۳/۰)	نواحی	مورد
۲۵۲ (۵۰/۲)	۱۷۱ (۴۰/۷)	۲۰۰ (۴۴/۲)			۵۴۵ (۶۷/۰)	شاهد	
۲۳۵ (۴۷/۲)	۱۶۹ (۴۱/۱)	۱۷۷ (۴۱/۵)			۳۷۹ (۴۶/۶)	جنس	زن
۲۶۳ (۵۲/۸)	۲۴۲ (۵۸/۹)	۲۵۰ (۵۸/۵)			۴۳۵ (۵۳/۴)		مرد
۱۴۸۲ (۷۳/۵)	۵۰۰ (۵۰/۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۳۷۶ (۵۴/۲)	۵۱۲ (۵۵/۵)	نواحی	مورد
۵۳۳ (۲۶/۵)	۵۰۰ (۵۰/۰)			۳۱۸ (۴۵/۸)	۴۱۱ (۴۴/۵)	شاهد	
۹۹۳ (۴۹/۳)	۲۰۰ (۲۰/۰)			۱۹۱ (۲۷/۵)	۲۶۲ (۲۸/۴)	بهورز	
۱۷۲ (۸/۵)	۰ (۰)			۹۴ (۱۳/۵)	۲۰۰ (۲۱/۷)	کاردان	
۱۲۸ (۶/۳)	۲۰۰ (۲۰/۰)			۲۱۸ (۳۱/۴)	۱۴۹ (۱۶/۱)	کارشناس	
۱۸۰ (۸/۹)	۰ (۰)			۰ (۰)	۳۱۲ (۳۳/۸)	رابط	
۵۴۲ (۲۶/۹)	۲۰۰ (۲۰/۰)			۰ (۰)	۰ (۰)	پرستار	
۰ (۰)	۴۰۰ (۴۰/۰)			۱۹۱ (۲۷/۵)	۰ (۰)	پزشک	

ساله با نمونه‌های مستقل و یک مطالعه‌ی طولی با اندازه‌گیری‌های مکرر با استفاده از یک مداخله‌ی آموزشی ۶ ساله (۸۶-۱۹۸۰) بر روی تمام ساکنین ناحیه‌ی مورد بررسی و همچنین، پی‌گیری این مداخلات تا سال ۱۹۹۲ انجام شد. در این مطالعه، با انتساب تصادفی، دو شهر Monterey (n = ۴۳۴۰۰) و Salinas (n = ۸۰۵۰۰) به عنوان ناحیه‌ی مورد و سه شهر Modesto (n = ۱۳۲۴۰۰)، San Luis Obispo و Santa Maria (n = ۳۹۷۰۰) به عنوان ناحیه‌ی شاهد در نظر گرفته شد. در این مطالعه، خانوارهای نواحی مورد و شاهد به تصادف انتخاب و سپس، همه‌ی افراد ۷۴-۱۲ سال خانوار دعوت به مطالعه شدند (۵۸-۵۷).

از دیگر برنامه‌های مداخلاتی در دنیا، برنامه‌ی قلب سالم Minnesota (Minnesota heart health program) است. این مطالعه، به عنوان یک مطالعه‌ی جامعه‌نگر غیر تصادفی در پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های قلبی - عروقی و استروک در سال‌های ۹۰-۱۹۸۰ روی جمعیت عمومی ۷۴-۲۵ سال، بچه‌های کلاس ششم تا دهم و کارمندان ۱۱۹ مؤسسه‌ی شرکت کننده در مطالعه انجام شد. این برنامه‌ی شبه تجربی - مداخلاتی ۵-۶ ساله در سطح اجتماع و افراد، روی حدود ۴۰۰ هزار نفر در ۶ جامعه‌ی منتخب از Minnesota و Dakota شمالی و جنوبی در شمال غربی ایالات متحده‌ی آمریکا به اجرا درآمد. در این برنامه، مناطق مورد و شاهد از نظر اندازه‌ی جمعیت (۱۱۰۰۰۰-۲۵۰۰۰)، نوع جامعه (روستایی کوچک، روستایی متوسط و شهری) و مسافت آن‌ها تا یک منطقه‌ی شهری خاص همسان شده‌اند، اما تخصیص جوامع به نواحی مورد و شاهد به صورت غیر تصادفی صورت گرفت. حجم نمونه در کل زمان مطالعه

بحث

بیماری قلبی - عروقی، یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است، که نه تنها در کشورهای صنعتی و توسعه یافته، بلکه در کشورهای در حال توسعه نیز، که تحت تأثیر تغییرات قابل توجهی در شیوه‌ی زندگی به عنوان نتیجه‌ی از صنعتی شدن سریع هستند، به صورت روزافزونی در حال افزایش است (۵۵). از سال ۱۹۷۰ تاکنون، مطالعات جامعه‌نگر زیادی در دنیا با هدف پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی - عروقی و عوامل خطر آن انجام شده است. یک مرور متون در کشور سوئد گزارش کرد که تنها ۸ برنامه‌ی قلب سالم جامعه‌نگر با معیارهای مناسب برای طراحی مطالعه و ارزشیابی وجود دارد؛ از جمله‌ی این مطالعات، می‌توان به مطالعه‌ی سه و پنج جامعه‌ی Stanford، برنامه‌ی قلب سالم Minnesota و مطالعه‌ی Karelia شمالی فنلاند اشاره کرد (۵۶).

در سال ۱۹۷۲، مطالعه‌ی میدانی سه جامعه‌ی Stanford (Stanford three community study) با هدف بررسی عوامل خطر بیماری‌های قلبی - عروقی از طریق یک برنامه‌ی ارتقای سلامت در دو شهر ایالت California به عنوان نواحی مورد و یک شهر به عنوان ناحیه‌ی شاهد انجام شد. در سال ۱۹۷۸، بر اساس مطالعه‌ی سه جامعه‌ی Stanford در California، یک مطالعه‌ی شبه تجربی جامعه‌نگر روی شهروندان معمولی ۷۴-۱۲ سال در شمال California به نام پروژه‌ی پنج شهر Stanford (Stanford five-city project) بنا نهاده شد. این مطالعه، با هدف بررسی تغییرات شیوع عوامل خطر بیماری‌های قلبی - عروقی، عوارض و مرگ و میر ناشی از آن بر اساس اجرای یک برنامه‌ی مداخلاتی بزرگ جامعه‌نگر در قالب یک مطالعه‌ی مقطعی چهار

از شهروندان ۶۹-۳ ساله‌ی تهران با توزیع سنی و جنسی مشابه کل جمعیت تهران، به روش تصادفی خوشه‌ای چند مرحله‌ای از منطقه‌ی ۱۳ شهرداری تهران (از بین ۲۲ منطقه‌ی این شهر) که تحت پوشش سه مرکز ارایه دهنده‌ی مراقبت‌های اولیه‌ی بهداشتی (از بین ۲۰ مرکز بهداشت در این منطقه) بودند، انتخاب و وارد مطالعه‌ی مقطعی پایه شدند. با پی‌گیری افراد مطالعه‌ی مقطعی مرحله‌ی اول، مرحله‌ی مداخلات این مطالعه برای بهبود سبک زندگی سالم و پیش‌گیری اولیه، ثانویه و ثالثیه از بیماری‌های غیر واگیر آغاز شد و نمونه‌ها در فواصل سه سال پی‌گیری شدند. گروه‌های هدف این مداخلات، شامل دانش‌آموزان، زنان خانه‌دار و افراد در معرض خطر بودند. در مرحله‌ی دوم این مطالعه، مداخلات روی ۵۶۳۰ نفر که تحت پوشش یکی از سه مرکز بهداشتی-درمانی مورد نمونه‌گیری و همچنین به دور از دو مرکز دیگر بودند، انجام شد. ۹۳۷۵ نفر که تحت پوشش دو مرکز بهداشت دیگر بودند، به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند (۵۵).

برنامه‌ی مداخلاتی بزرگ و جامعه‌نگر قلب سالم اصفهان شامل مشترکات زیادی با مطالعات مطرح در سطح دنیا می‌باشد؛ ویژگی‌های بارز مشترک و گاه متمایز این مطالعه از مطالعات بزرگ دنیا در این حوزه به شرح زیر می‌باشد:

- مداخلات متنوع این برنامه در قالب ۱۰ طرح مداخلاتی مختلف بر حسب گروه‌های هدف، با تکیه بر تغذیه‌ی صحیح، مبارزه با دخانیات، ورزش و فعالیت فیزیکی و نحوه‌ی مقابله با استرس‌ها بر روی آحاد جامعه؛

- دارا بودن هر دوی مطالعات مقطعی با نمونه‌های مستقل در سه مرحله به مدت ۶ سال و مطالعه‌ی طولی (در حال انجام) با اندازه‌گیری‌های مکرر برای ارزیابی تغییرات؛

- مد نظر قرار دادن گروه‌های هدف مختلف در زیر مطالعات این برنامه، بالغین ۱۹ سال به بالا، دانش‌آموزان مقطع راهنمایی و دبیرستان، والدین این دانش‌آموزان، والدین کودکان ۱۰-۲ سال مقاطع پیش‌دبستانی و دبستان، معلمان و مسئولین مدارس، بیماران قلبی-عروقی و پرسنل بهداشتی شامل بهورز، کاردان، کارشناس، رابط بهداشتی و پزشک عمومی و متخصص؛

- داشتن نواحی مورد و شاهد؛

- حجم نمونه‌ی قابل توجه در زیر مطالعات

- فرایند نمونه‌گیری اصولی و متناسب با ساختار هر زیر جامعه برای انتخاب افراد؛

- محدود نبودن آن به منطقه‌ای خاص همراه با پوشش کامل منطقه‌ی مورد مطالعه در نمونه‌گیری؛

- احتساب نسبت‌های جمعیتی از نظر گروه‌های سنی، جنسی و محل اقامت (شهر یا روستا) در فرایند نمونه‌گیری؛

در منطقه‌ی مورد، حدود ۲۳۱۲۲۲ نفر و در منطقه‌ی شاهد ۱۸۱۱۴۹ بود. در این برنامه، عوامل خطر و رفتارهای مرتبط با آن، قبل از شروع برنامه‌ی مداخلاتی و همچنین سالانه، به مدت ۷-۶ سال پی‌گیری در تمام ۶ جامعه اندازه‌گیری شده است. مطالعات مقطعی برنامه‌ی قلب سالم Minnesota به طور دوره‌ای، با انتخاب تصادفی افراد در هر جامعه با یک روش نمونه‌گیری خوشه‌ای دو مرحله‌ای انجام شد. مطالعه‌ی هم‌گروهی این برنامه نیز متشکل از شرکت کنندگان با انتخاب تصادفی از همه‌ی مطالعات مقطعی (قبل از شروع مداخلات) است (۶۰-۵۹).

مطالعه‌ی North Karelia Project به عنوان یکی از مطالعات مداخلاتی موفق در دنیا، در کشور فنلاند با هدف تغییر شیوه‌ی زندگی، کنترل و پیش‌گیری از عوامل خطر ساز اصلی بیماری‌های قلبی-عروقی در سال ۱۹۷۲ آغاز شد. بعد از اجرای طرح اصلی و حصول نتایج اولیه‌ی آن در سال‌های ۷۷-۱۹۷۲، از تجارب این برنامه برای اجرای یک اقدام ملی و فعالیت‌های پیش‌گیرانه در سراسر کشور استفاده شد. مطالعات مقطعی این پروژه در استان Karelia شمالی به عنوان ناحیه‌ی مورد و در استان Kuopio به عنوان منطقه‌ی شاهد هر ۵ سال یک بار در سال‌های ۱۹۷۲، ۱۹۷۷، ۱۹۸۲، ۱۹۸۷ و ۱۹۹۲ انجام شد. در هر بررسی مقطعی، یک نمونه‌ی تصادفی برای هر استان از سیستم ثبت جمعیت کشوری انتخاب شد. در مطالعات سال‌های ۱۹۷۲ و ۱۹۷۷ هر نمونه شامل ۶/۶ درصد از افراد متولد شده بین سال‌های ۴۷-۱۹۱۳ بود. این در حالی است که سه مطالعه‌ی مقطعی دیگر در سال‌های ۱۹۸۲، ۱۹۸۷ و ۱۹۹۲ متشکل از افراد ۶۴-۲۵ ساله بود. دامنه‌ی سنی مشترک در همه‌ی این سال‌ها، بین ۵۹-۳۵ سال می‌باشد. این نمونه‌ها طوری طبقه‌بندی شده‌اند که حداقل ۲۵۰ نفر از هر جنس و گروه سنی ۱۰ ساله ۳۴-۲۵، ۴۴-۳۵، ۵۴-۴۵ و ۶۴-۵۵ در هر منطقه انتخاب شوند. حجم نمونه‌ی بررسی شده در دو استان مورد و شاهد در سال‌های ۱۹۷۲، ۱۹۷۷، ۱۹۸۲، ۱۹۸۷ و ۱۹۹۲ به ترتیب ۹۸۸۲، ۱۰۰۱۲، ۵۷۱۲، ۴۵۱۲ و ۳۰۱۲ نفر می‌باشد (۶۲-۶۱).

در ایران نیز مطالعات مداخلاتی با هدف پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی و عوامل خطر آن انجام شده است. مطالعه‌ی قند و لیپید تهران به منظور تعیین عوامل خطر ساز آترواسکلروز و با هدف تغییر در شیوه‌ی زندگی مردم و پیش‌گیری از روند رو به رشد دیابت، دیس‌لیپیدمی و سایر عوامل خطر ساز بیماری‌های قلبی-عروقی طراحی شده است. طراحی این پژوهش شامل دو مرحله‌ی اصلی است: مرحله‌ی اول، یک مطالعه‌ی مقطعی برای تعیین شیوع عوامل خطر ساز بیماری‌های قلبی-عروقی است که از فروردین ۱۳۷۸ تا شهریور ۱۳۸۰ به طول انجامید؛ و مرحله‌ی دوم متشکل از یک مطالعه‌ی هم‌گروهی، مداخلاتی و آینده‌نگر است که برای حداقل ۲۰ سال طراحی شده است. جمعیت ۱۵۰۰۵ نفر

عوامل خطر ساز و پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی - عروقی شود.

تشکر و قدردانی

بودجه‌ی برنامه‌ی قلب سالم اصفهان، توسط سازمان برنامه و بودجه (طرح شماره‌ی ۳۱۳۰۹۳۰۴)، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، مرکز تحقیقات قلب و عروق و حوزه‌ی معاونت بهداشتی استان اصفهان که هر دو وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشند، تأمین شده است. بدین وسیله، از همکاری کارکنان مراکز بهداشتی استان‌های اصفهان و مرکزی و همچنین پرسنل محترم مرکز تحقیقات قلب و عروق قدردانی می‌گردد.

- جمع‌آوری حجم وسیعی از اطلاعات در مورد مشخصه‌های جمعیت شناختی، وضعیت اقتصادی - اجتماعی، آگاهی، نگرش و عملکرد در مورد عوامل خطر ساز قلبی و سبک زندگی، استرس، راه‌های مقابله با آن و کیفیت زندگی، شرح حال و انجام معاینات بالینی و پاراکلینیکی، اندازه‌گیری‌های فیزیکی و بیوشیمیایی.

تجربه‌ی برنامه‌ی قلب سالم اصفهان با روش ترکیب مداخله و ارزشیابی، نشان داد که انجام یک رویکرد جامع یکپارچه برای پیش‌گیری از بیماری‌های غیر واگیر در کشورهای در حال توسعه و همچنین پیاده‌سازی تحقیقات در عمل امکان‌پذیر است و می‌تواند رفتارهای مرتبط با سبک زندگی افراد را ارتقا دهد و موجب کنترل

References

- Mendis S, Puska P, Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
- Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int J Cardiol* 2010; 141(2): 122-31.
- World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, Switzerland: WHO; 2004.
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380(9859): 2197-223.
- Reddy KS. Cardiovascular disease in non-Western countries. *N Engl J Med* 2004; 350(24): 2438-40.
- Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001; 104(22): 2746-53.
- Sarraf-Zadegan N, Sayed-Tabatabaei FA, Bashardoust N, Maleki A, Totonchi M, Habibi HR, et al. The prevalence of coronary artery disease in an urban population in Isfahan, Iran. *Acta Cardiol* 1999; 54(5): 257-63.
- Shahraz S, Forouzanfar MH, Sepanlou SG, Dicker D, Naghavi P, Pourmalek F, et al. Population health and burden of disease profile of Iran among 20 countries in the region: from Afghanistan to Qatar and Lebanon. *Arch Iran Med* 2014; 17(5): 336-42.
- Farzadfar F, Danaei G, Namdaritabar H, Rajaratnam JK, Marcus JR, Khosravi A, et al. National and subnational mortality effects of metabolic risk factors and smoking in Iran: a comparative risk assessment. *Popul Health Metr* 2011; 9(1): 55.
- Kabagambe EK, Baylin A, Campos H. Nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica: modifiable risk factors, population-attributable risks, and adherence to dietary guidelines. *Circulation* 2007; 115(9): 1075-81.
- Ebrahimi-Mameghani M, Toupchian O, Farsad Naimi A, Nurmohammadi M. Women's knowledge and attitude toward cardiovascular diseases risk factors and its relation with obesity and biochemical factors. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2011; 33(2): 1-7. [In Persian].
- Sarrafzadegan N, Kelishadi R, Esmailzadeh A, Mohammadifard N, Rabiei K, Roohafza H, et al. Do lifestyle interventions work in developing countries? Findings from the Isfahan Healthy Heart Program in the Islamic Republic of Iran. *Bull World Health Organ* 2009; 87(1): 39-50.
- Kelishadi R, Pashmi R, Sadri Gh, Sarraf-Zadegan N, Ahmadi M, Mohammadzadeh M, et al. Healthy Heart Program: heart health promotion from childhood. *J Qazvin Univ Med Sci* 2003; 7(2): 15-26. [In Persian].
- Noto D, Cefalu AB, Barbegalio CM, Sapienza M, Cavera G, Nardi I, et al. Hypertension and diabetes mellitus are associated with cardiovascular events in the elderly without cardiovascular disease. Results of a 15-year follow-up in a Mediterranean population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19(5): 321-6.
- Dawber TR, Meadors GF, Moore FE. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health* 1951; 41(3): 279-81.
- Ovcarov VK, Bystrova VA. Present trends in mortality in the age group 35--64 in selected developed countries between 1950--1973. *World Health Stat Q* 1978; 31(3): 208-346.
- Sarraf-Zadegan N, Sadri G, Malek AH, Baghaei M, Mohammadi FN, Shahrokhi S, et al. Isfahan Healthy Heart Programme: a comprehensive integrated community-based programme for cardiovascular disease prevention and control. Design, methods and initial experience. *Acta Cardiol* 2003; 58(4): 309-20.
- Sarrafzadegan N, Baghaei A, Sadri G, Kelishadi R, Malekafzali H, Boshtam M, et al. Isfahan healthy heart program: Evaluation of comprehensive, community-based interventions for non-communicable disease prevention. *Prevention and Control* 2006; 2(2): 73-84.
- Kelishadi R, Sadry G, Zadegan NS, Hashemipour M, Sabet B, Bashardoust N, et al. Smoking, adolescents and health: Isfahan healthy heart programme-heart health promotion from childhood. *Asia Pac J Public*

- Health 2004; 16(1): 15-22.
20. Sadeghi M, Roohafza H, Shirani S, Poormoghadas M, Kelishadi R, Baghaei A, et al. Diabetes and associated cardiovascular risk factors in Iran: the Isfahan Healthy Heart Programme. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36(3): 175-80.
 21. Gharipour M, Kelishadi R, Sarrafzadegan N, Baghaei A, Yazdani M, Anaraki J, et al. The association of smoking with components of the metabolic syndrome in non-diabetic patients. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37(11): 919-23.
 22. Sarrafzadegan N, Kelishadi R, Baghaei A, Hussein SG, Malekafzali H, Mohammadifard N, et al. Metabolic syndrome: an emerging public health problem in Iranian women: Isfahan Healthy Heart Program. *Int J Cardiol* 2008; 131(1): 90-6.
 23. Bahonar A, Khosravi A, Esmaeliani H, Babak A, Rahmati M, Jamshidi A, et al. Methods of implementing the operational phases of the Health Professionals Education Project-Isfahan Healthy Heart Program (IHHP-HPEP). *ARYA Atheroscler* 2009; 5(3): 102-5.
 24. Roohafza H, Sadeghi M, Shirani S, Bahonar A, Mackie M, Sarrafzadegan N. Association of socioeconomic status and life-style factors with coping strategies in Isfahan Healthy Heart Program, Iran. *Croat Med J* 2009; 50(4): 380-6.
 25. Sarrafzadegan N, Sadeghi M, Tavassoli A, Mohseni M, Alikhasi H, Rabiei K, et al. Sex differences in the impact of a community-based program for non-communicable disease prevention: The Isfahan Healthy Heart Program (IHHP). *Journal of Public Health* 2009; 17(4): 257-63.
 26. Shirani S, Kelishadi R, Sarrafzadegan N, Khosravi A, Sadri G, Amani A, et al. Awareness, treatment and control of hypertension, dyslipidaemia and diabetes mellitus in an Iranian population: the IHHP study. *East Mediterr Health J* 2009; 15(6): 1455-63.
 27. Baghaei A, Sarrafzadegan N, Rabiei K, Gharipour M, Tavassoli AA, Shirani S, et al. How effective are strategies for non-communicable disease prevention and control in a high risk population in a developing country? Isfahan Healthy Heart Programme. *Arch Med Sci* 2010; 6(1): 24-31.
 28. Boshtam M, Sarrafzadegan N, Zare K, Sadeghi S, Sajjadi F, Rabiei K, et al. Effects of 5-year interventions on cardiovascular risk factors of factories and offices employees of Isfahan and Najafabad: worksite intervention project-Isfahan healthy heart program. *ARYA Atheroscler* 2010; 6(3): 94-101.
 29. Heidari R, Sadeghi M, Talaei M, Rabiei K, Mohammadifard N, Sarrafzadegan N. Metabolic syndrome in menopausal transition: Isfahan Healthy Heart Program, a population based study. *Diabetol Metab Syndr* 2010; 2: 59.
 30. Khosravi A, Mehr GK, Kelishadi R, Shirani S, Gharipour M, Tavassoli A, et al. The impact of a 6-year comprehensive community trial on the awareness, treatment and control rates of hypertension in Iran: experiences from the Isfahan healthy heart program. *BMC Cardiovasc Disord* 2010; 10: 61.
 31. Rabiei K, Kelishadi R, Sarrafzadegan N, Sadri G, Amani A. Short-term results of community-based interventions for improving physical activity: Isfahan Healthy Heart Programme. *Arch Med Sci* 2010; 6(1): 32-9.
 32. Sadeghi A, Ramezani J, Sanei H, Rabeiee K, Gharipour M, Toghianifar N. Adherence to evidence-based therapies and modifiable risk factors in patients with coronary artery disease - the HLCP Project. *ARYA Atheroscler* 2006; 2(3): 147-51.
 33. Bahonar A, Sarrafzadegan N, Kelishadi R, Shirani S, Ramezani MA, Taghdisi MH, et al. Association of socioeconomic profiles with cardiovascular risk factors in Iran: the Isfahan Healthy Heart Program. *Int J Public Health* 2011; 56(1): 37-44.
 34. Gharipour M, Kelishadi R, Toghianifar N, Mackie M, Yazdani M, Noori F, et al. Sex based pharmacological treatment in patients with metabolic syndrome: Findings from the Isfahan healthy heart program. *Afr J Pharm Pharmacol* 2011; 5(3): 311-6.
 35. Najafian J, Toghianifar N, Mohammadifard N, Nouri F. Association between sleep duration and metabolic syndrome in a population-based study: Isfahan Healthy Heart Program. *J Res Med Sci* 2011; 16(6): 801-6.
 36. Roohafza H, Ramezani M, Sadeghi M, Shahn Timer M, Zolfagari B, Sarrafzadegan N. Development and validation of the stressful life event questionnaire. *Int J Public Health* 2011; 56(4): 441-8.
 37. Sarrafzadegan N, Rabiei K, Alavi M, Abedi H, Zarfeshani S. How can the results of a qualitative process evaluation be applied in management, improvement and modification of a preventive community trial? The IHHP Study. *Arch Public Health* 2011; 69(1): 9.
 38. Feizi A, Aliyari R, Roohafza H. Association of perceived stress with stressful life events, lifestyle and sociodemographic factors: a large-scale community-based study using logistic quantile regression. *Comput Math Methods Med* 2012; 2012: 151865.
 39. Kelishadi R, Mohammadifard N, Sarrafzadegan N, Nouri F, Pashmi R, Bahonar A, et al. The effects of a comprehensive community trial on cardiometabolic risk factors in adolescents: Isfahan Healthy Heart Program. *ARYA Atheroscler* 2012; 7(4): 184-90.
 40. Mohammadifard N, Sarrafzadegan N, Nouri F, Sajjadi F, Alikhasi H, Maghroun M, et al. Using factor analysis to identify dietary patterns in Iranian adults: Isfahan Healthy Heart Program. *Int J Public Health* 2012; 57(1): 235-41.
 41. Toghianifar N, Najafian J, Pooya A, Rabiei K, Eshrati B, Anaraki J, et al. Association of smoking status with quality of life in a cross-sectional population-based sample of Iranian adults: Isfahan Healthy Heart Program. *Asia Pac J Public Health* 2012; 24(5): 786-94.
 42. Ahmadi A, Gharipour M, Nouri F, Sarrafzadegan N. Metabolic syndrome in Iranian youths: a population-based study on junior and high schools students in rural and urban areas. *J Diabetes Res* 2013; 2013: 738485.
 43. Roohafza H, Sarrafzadegan N, Sadeghi M, Rafieian-Kopaei M, Sajjadi F, Khosravi-Boroujeni H. The association between stress levels and food

- consumption among Iranian population. *Arch Iran Med* 2013; 16(3): 145-8.
44. Sarrafzadegan N, Gharipour M, Sadeghi M, Nouri F, Asgary S, Zarfeshani S. Differences in the prevalence of metabolic syndrome in boys and girls based on various definitions. *ARYA Atheroscler* 2013; 9(1): 70-6.
 45. Sarrafzadegan N, Kelishadi R, Sadri G, Malekafzali H, Pourmoghaddas M, Heidari K, et al. Outcomes of a comprehensive healthy lifestyle program on cardiometabolic risk factors in a developing country: the Isfahan Healthy Heart Program. *Arch Iran Med* 2013; 16(1): 4-11.
 46. Talaie M, Rabiei K, Talaei Z, Amiri N, Zolfaghari B, Kabiri P, et al. Physical activity, sex, and socioeconomic status: A population based study. *ARYA Atheroscler* 2013; 9(1): 51-60.
 47. Ahmadi A, Gharipour M, Nouri F, Kelishadi R, Sadeghi M, Sarrafzadegan N. Association between adolescence obesity and metabolic syndrome: Evidence from Isfahan Healthy Heart Program. *Indian J Endocrinol Metab* 2014; 18(4): 569-73.
 48. Najafian J, Mohammadifard N, Naeini FF, Nouri F. Relation between usual daily walking time and metabolic syndrome. *Niger Med J* 2014; 55(1): 29-33.
 49. Roohafza H, Khani A, Sadeghi M, Bahonar A, Sarrafzadegan N. Health volunteers' knowledge of cardiovascular disease prevention and healthy lifestyle following a community trial: Isfahan healthy heart program. *J Educ Health Promot* 2014; 3: 59.
 50. Sajjadi F, Gharipour M, Mohammadifard N, Nouri F, Maghroun M, Alikhasi H. Relationship between legumes consumption and metabolic syndrome: Findings of the Isfahan Healthy Heart Program. *ARYA Atheroscler* 2014; 10(1): 18-24.
 51. Mohammadifard N, Sajjadi F, Maghroun M, Alikhasi H, Nilforoushzadeh F, Sarrafzadegan N. Validation of a simplified food frequency questionnaire for the assessment of dietary habits in Iranian adults: Isfahan Healthy Heart Program, Iran. *ARYA Atheroscler* 2015; 11(2): 139-46.
 52. Sarrafzadegan N, Talaie M, Sadeghi M, Kelishadi R, Oveisgharan S, Mohammadifard N, et al. The Isfahan cohort study: rationale, methods and main findings. *J Hum Hypertens* 2011; 25(9): 545-53.
 53. Kafeshani O, Sarrafzadegan N, Nouri F, Mohammadifard N. Major dietary patterns in Iranian adolescents: Isfahan Healthy Heart Program, Iran. *ARYA Atheroscler* 2015; 11(Suppl 1): 61-8.
 54. Nouri F, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, Sadeghi M, Mansourian M. Intake of legumes and the risk of cardiovascular disease: frailty modeling of a prospective cohort study in the Iranian middle-aged and older population. *Eur J Clin Nutr* 2016; 70(2): 217-21.
 55. Azizi F, Ghanbarian A, Momenan AA, Hadaegh F, Mirmiran P, Hedayati M, et al. Prevention of non-communicable disease in a population in nutrition transition: Tehran Lipid and Glucose Study phase II. *Trials* 2009; 10: 5.
 56. The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU). Att forebygga sjukdom i hjarta och karl genom befolknings inriktade program en systematisk litteraturoversikt. [The community control prevention programme for cardiovascular diseases critical literature review.] (SBU Report No. 134). Stockholm, Sweden: SBU; 1997. [In Swedish].
 57. Farquhar JW, Fortmann SP, Maccoby N, Haskell WL, Williams PT, Flora JA, et al. The Stanford Five-City Project: design and methods. *Am J Epidemiol* 1985; 122(2): 323-34.
 58. Fortmann SP, Varady AN. Effects of a community-wide health education program on cardiovascular disease morbidity and mortality: the Stanford Five-City Project. *Am J Epidemiol* 2000; 152(4): 316-23.
 59. Luepker RV, Murray DM, Jacobs DR, Jr., Mittelmark MB, Bracht N, Carlaw R, et al. Community education for cardiovascular disease prevention: risk factor changes in the Minnesota Heart Health Program. *Am J Public Health* 1994; 84(9): 1383-93.
 60. Luepker RV, Rastam L, Hannan PJ, Murray DM, Gray C, Baker WL, et al. Community education for cardiovascular disease prevention. Morbidity and mortality results from the Minnesota Heart Health Program. *Am J Epidemiol* 1996; 144(4): 351-62.
 61. Vartiainen E, Puska P, Pekkanen J, Tuomilehto J, Jousilahti P. Changes in risk factors explain changes in mortality from ischaemic heart disease in Finland. *BMJ* 1994; 309(6946): 23-7.
 62. Nissinen A, Berrios X, Puska P. Community-based noncommunicable disease interventions: lessons from developed countries for developing ones. *Bull World Health Organ* 2001; 79(10): 963-70.

Isfahan Healthy Heart Program, Sample Size and Sampling Structure: A Comprehensive Report

Fatemeh Nouri MSc¹, Awat Feizi PhD², Noushin Mohammadifard MSc¹, Nizal Sarrafzadegan MD³

Original Article

Abstract

Background: One of the important strategies for preventing and controlling cardiovascular diseases (CVD) is providing training through interventions at the population. This study aimed to explain the sample size and sampling structure of the Isfahan Healthy Heart Program (IHHP). This program was considered as a comprehensive community-based interventional trial to modify population lifestyle in relation to cardiovascular disease (CVD) and its risk factors prevention and control.

Methods: Isfahan Healthy Heart Program (IHHP) addressed four target groups including adults, health professionals, patients with cardiac diseases, and children and adolescents in three districts in Iran including Isfahan and Najaf Abad (intervention) and Arak (reference). It was consisted of three phases: baseline survey in 2000-2001, intervention in 2002-2005 and post-intervention survey in 2006-2007. Four evaluation studies were done during 2002 to 2005 to evaluate knowledge and behaviors improvements.

Findings: The sample sizes and sampling methods in the pre- and the post-intervention phases were as followed: 12514 and 9572 and quota, stratified, cluster, random, probability proportionate to size, systemic and simple random in adults; 1946 and 1992 and quotas, stratified, cluster, random, probability proportionate to size, simple random, simple random in adolescents; 923 and 2015 and simple random in health professionals; and also 814 and 502 and simple random in patients with cardiac diseases. We carried out a 10-year longitudinal cohort study entitled the Isfahan Cohort Study on population aged ≥ 35 years starting from the baseline to examine the incidence of cardiovascular disease events and to calculate the risk assessment chart for cardiovascular disease occurrence.

Conclusion: Isfahan Healthy Heart Program, as comprehensive community-based interventional trial in Iran, was so similar to the same worldwide.

Keywords: Isfahan Healthy Heart Program, Cardiovascular disease, Prevention and control, Sample size, Sampling structure

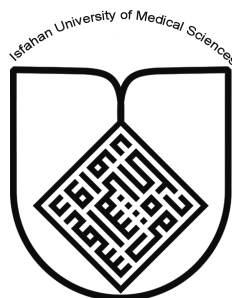
Citation: Nouri F, Feizi A, Mohammadifard N, Sarrafzadegan N. **Isfahan Healthy Heart Program, Sample Size and Sampling Structure: A Comprehensive Report.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(362): 2152-66

1- Isfahan Cardiovascular Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health AND Cardiac Rehabilitation Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Isfahan Cardiovascular Research Center, Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Awat Feizi PhD, Email: awat_feizi@hlth.mui.ac.ir

Editorial Board (In alphabetical order)

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



JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 33, No. 362, 2nd Week February 2016

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

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

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

Associate Editor: **Maryam Radahmadi PhD**

Published by:

Isfahan University of Medical Sciences

E-mail: publications@mui.ac.ir

Office:

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

Telefax: +98 31 37922291

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

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

Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy edit, Layout edit, Design and Print:

Farzanegan Radandish Co.

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

Telefax: +98 31 36686302

E-mail: esfahanfarzanegan@yahoo.com

f.radandish@gmail.com

www.farzaneganco.ir

Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexers

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

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

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