

سر مقاله

۱۹۵۳ فارماکواپیدمیولوژی چیست؟
 دکتر میرعلیمحمدسبزوایی

مقاله های پژوهشی

۱۹۵۵ تهیهی کوئز و گه ی پلی ساکراید کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A با پروتئین ریکامیننت هپاتیت B به عنوان یک ایمونوژن (تهیهی ایمونوژن از مننژیت و هپاتیت B)
 محبوبه محمدامینی، دکتر حجت احمدی، دکتر بهمن تبرایی

۱۹۶۵ طراحی روش جدید محاسبه ی پهنای متوسط لاین در تصاویر پالس فیلد ژل الکتروفورز جهت آشکارسازی و استخراج لاین
 محمد رضایی، دکتر محمود امیری، دکتر پرویز مهاجری، دکتر منصور رضایی

۱۹۷۳ بررسی تأثیر کاهش بعد بر فضای ویژگی های توپولوژیک شبکه ی ژن ساخته شده از میکروآرایه به منظور پیش گویی عود سرطان سینه
 دکتر علیرضا مهری دهنوی، حامد زند، دکتر محمدرضا صحتی

۱۹۸۶ شناسایی مولکولی گونه های Candida در بیماران مبتلا به Candidiasis در بیرجند با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز و پرش آنزیمی
 تکتم بخشی، دکتر سمیرا سالاری، دکتر علی ناصری، دکتر ایرج اسفندیارپور، محمد علی محمدی، پویا قاسمی نژاد آلمانی

۱۹۹۴ ارزیابی نقش تصویربرداری Diffusion tensor در درجه بندی تومورهای گلیال بر اساس آنیزوتروپی نسبی
 فریبا دوانیان، دکتر فریبرز فائق، دکتر سهراب شهزادی، زهرا فرشیدفر

۱۹۹۹ عوارض کودکان مبتلا به سندرم نفروتیک بستری شده در بیمارستان کودکان امام حسین (ع) اصفهان
 زهرا جوشقانی، دکتر آلاله قیصری، مجتبی کیکا

Editorial

Pharmacoepidemiology 1954
 Ali Mohammad Sabzghabae Pharm D

Original Articles

Preparation of ConjugateD Neisseria Meningitidis Type A Capsular Polysaccharide with Recombinant Protein of Hepatitis B as an Immunogen 1964
 Mahboobeh Mohamadamini MSc, Hojat Ahmadi MD, Bahman Tabaraie MD

A New Method for Calculating Lane Average Width on the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Images for Lane Detection and Extraction Problem 1972
 Mohammad Rezaei, Mahmood Amiri PhD, Parviz Mohajeri PhD, Mansour Rezaei PhD

Dimensionality Reduction on Topological Features of the Gene Network Constructed from Microarray Data for Prediction of Breast Cancer Recurrence 1985
 Alireza Mehridehnavi PhD, Hamed Zand, Mohammadreza Sehhati PhD

Molecular Identification of Candida Species in Patients with Candidiasis in Birjand, Iran, Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay 1993
 Toktam Bakhshi MSc, Samira Salari PhD, Ali Naseri PhD, Iraj Esfandiarpour MD, Mohammad Ali Mohammadi MSc, Pooya Ghasemi Nejad Almani PhD

Evaluation of the Role of Diffusion Tensor Imaging in Grading of Glial Tumors based on Relative Anisotropy ... 1998
 Fariba Davnian MSc, Fariborz Faeghi PhD, Sohrab Shahzadi MD, Zahra Shidfar MSc

Complications of Children with Nephrotic Syndrome Hospitalized at Imam Hossein Pediatric Hospital, Isfahan, Iran 2003
 Zahra Joshaghani, Alaleh Gheisari MD, Mojtaba Keikha MSc



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۵۹)، هفته سوم دی 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 منحصر 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 سر دبیر- 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 پرانتز ذکر گردد. اگر از دارو در مطالعه استفاده شده است باید نام ژنریک، دوز و روش مصرف آن آورده شود. در مورد افراد و بیماران تحت مطالعه باید جنس و سن (همراه انحراف معیار) آورده شود. در مورد نرم افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

-اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

نمونه انگلیسی:

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

نمونه فارسی:

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

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

- اگر منبع مورد نظر کتاب است:

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

نمونه انگلیسی:

Romenes GJ. Cunningham's manual. 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: Tailor 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

سر مقاله

فارماکوپیدمیولوژی چیست؟..... ۱۹۵۳
دکتر میرعلیمحمد سبزقبائی

مقاله‌های پژوهشی

تهیه‌ی کونژوگه‌ی پلی‌ساکارید کیسولی نایسریا منتزیتیدیس سروتاپ A با پروتئین ریکامیننت هیاتیت B به عنوان یک ایمونوژن (تهیه‌ی ایمونوژن از منتزیت و هیاتیت B)..... ۱۹۵۵
محبوبه محمداینی، دکتر حجت احمدی، دکتر بهمن تبرایی

طراحی روش جدید محاسبه‌ی پهنای متوسط لاین در تصاویر پالس فیلد ژل الکتروفورز جهت آشکارسازی و استخراج لاین..... ۱۹۶۵
محمد رضایی، دکتر محمود امیری، دکتر پرویز مهاجری، دکتر منصور رضایی

بررسی تأثیر کاهش بعد بر فضای ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن ساخته شده از میکروآرایه به منظور پیش‌گویی عود سرطان سینه..... ۱۹۷۳
دکتر علیرضا مهری دهنوی، حامد زند، دکتر محمدرضا صحتی

شناسایی مولکولی گونه‌های *Candida* در بیماران مبتلا به *Candidiasis* در بیرجند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و برش آنزیمی..... ۱۹۸۶
تکتم بخشی، دکتر سمیرا سالاری، دکتر علی ناصری، دکتر ایرج اسفندیاریپور، محمد علی محمدی، پویا قاسمی‌نژاد آلمانی

ارزیابی نقش تصویربرداری *Diffusion tensor* در درجه‌بندی تومورهای گلیال بر اساس آنیزوتروپی نسبی..... ۱۹۹۴
فریبا دوانیان، دکتر فریبرز فائق، دکتر سهراب شهزادی، زهرا فرشیدفر

عوارض کودکان مبتلا به سندرم نفروتیک بستری شده در بیمارستان کودکان امام حسین (ع) اصفهان..... ۱۹۹۹
زهرا جوشقانی، دکتر آلاله قیصری، مجتبی کیخا

فارماکوپیدمیولوژی چیست؟

دکتر میرعلیمحمد سبزقبائی^۱

سر مقاله

جناب آقای دکتر میرعلیمحمد سبزقبائی به درخواست سردبیر مجله، سرمقاله‌ای در خصوص فارماکوپیدمیولوژی نگاشته‌اند که حضور خوانندگان محترم تقدیم می‌گردد.

فاکتورهای بالینی بیمار بر نتیجه‌ی درمانی مطلع باشد. به عنوان مثال بداند برای بیماری که مبتلا به عفونت و نارسایی شدید کبدی و کلیوی است، عارضه‌ی کلیوی جتتامایسین به مراتب نسبت به فردی که کبدی با عملکرد طبیعی دارد، پررنگ‌تر خواهد بود.

داروهای موجود در بازار دارویی به طور معمول پس از طی مراحل I، II و III کارآزمایی بالینی، مجوز مصرف در جامعه را از سازمان‌های ذی‌ربط بین‌المللی گرفته‌اند و کتب رسمی تخصص‌های مختلف پزشکی به استناد این مجوز و مقالات منتشر شده‌ی کارآزمایی بالینی کنترل شده و تصادفی، نام این داروهای جدید را در دستورالعمل‌های درمانی وارد می‌نمایند. در طی این سه مرحله، به طور متوسط بین ۳۰۰ تا حداکثر ۳۰۰۰ بیمار تحت شرایط کنترل شده از نظر بیماری و مصرف داروهای هم‌زمان، در معرض دارو قرار می‌گیرند و در این شرایط احتمال عدم مشاهده‌ی بعضی عوارض بالقوه‌ی کشنده و خطرناک امکان‌پذیر نیست و در عین حال شبیه‌سازی مناسبی برای مصرف واقعی دارو در سطح جامعه نمی‌باشد. به عبارت دیگر، پس از طی مراحل سه‌گانه‌ی کارآزمایی بالینی، هنوز ایمنی مصرف دارو به درستی بررسی نشده است و بررسی اثرات دارو در جمعیت‌های انسانی ضروری می‌باشد. به همین دلیل است که در همان جوامعی که دارو تولید و به بازار عرضه می‌شود، تجویز دارو در مراکز درمانی و مطب‌های پزشکی تنها در صورت وجود دارو در لیست داروهای مجاز به تجویز همان بیمارستان یا مرکز پزشکی صورت می‌گیرد و ورود نام دارو به این فهرست، با اخذ اطلاعات کافی از نظر فاز چهارم کارآزمایی بالینی که همان PMS (Postmarketing surveillance) می‌باشد، امکان‌پذیر است (۳).

همان‌گونه که پیش‌تر ذکر شد، فارماکوپیدمیولوژی شاخه‌ی جدیدی از علم فارماکوتراپی است که آثار مفید و همچنین عوارض

در دهه‌های اخیر، پزشکی مدرن به امکانات دارویی گسترده‌ای مجهز گردیده که موجب تقویت هرچه بیشتر این علم شده است. اگرچه این موضوع کیفیت درمان بیماران را بالا برده، اما باعث بروز صدمات حاصل از عوارض سوء این داروها نیز شده است و مسؤولیت بزرگی را بر دوش کارخانه‌های داروسازی در قبال تولید این محصولات متنوع دارویی نهاده است. در واقع، سیر تاریخ کشف و تولید داروها موازی با رخداد فاجعه‌های «واکنش‌های مضر دارویی» است و به نظر می‌رسد که تغییرات به وجود آمده در قوانین داروسازی در طی زمان، واکنشی سیاسی-اجتماعی در برابر اپیدمی ناشی از واکنش‌های مضر دارویی می‌باشد. تخمین زده می‌شود که در کشور ایالات متحده‌ی آمریکا، سالانه حدود صد هزار نفر به دلیل واکنش‌های مضر دارویی جان خود را از دست می‌دهند و این در حالی است که بین ۲۰ تا ۷۰ درصد این واکنش‌ها قابل پیش‌گیری می‌باشد (۱). به همین دلیل، اگرچه آسیب‌های ناشی از داروها منجر به پیدایش علم فارماکوپیدمیولوژی (که موضوع اصلی این فرایند می‌باشد) شد، اما اکنون این رشته به موضوعاتی فراتر از عوارض سوء داروها اختصاص یافته است.

علم فارماکولوژی طبق تعریف شامل بررسی اثر داروها بر سامانه‌های بیولوژیک و علم کلینیکال فارماکولوژی، مطالعه‌ی اثر داروها در جهت پیش‌گیری، درمان یا بازتوانایی در انسان‌ها است. خوشبختانه در زمان حاضر، مفاهیم فارماکوپیدمیولوژی به طور واضحی با مفاهیم کلینیکال فارماکولوژی در هم آمیخته است (۲). در راستای تلاش برای بهینه‌سازی مصرف داروها، اصل مهم کلینیکال فارماکولوژی این است که درمان باید به صورت ویژه و مناسب نیاز هر بیمار به صورت خاص باشد و این ویژه‌سازی نیز به تعیین میزان خطر و فایده‌ی مختص بیماران نیاز دارد. در این امر، به حضور فرد تجویز کننده نیاز است که از اثرات مفید و مضر دارو و چگونگی تأثیر

۱- دانشیار، مرکز پژوهش‌های توکسیکولوژی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر میرعلیمحمد سبزقبائی

مطالعات مربوط به روند استفاده از دارو، تمرکز اصلی خود را بر عوامل مؤثر بر تجویز، پیچیدن نسخه و مصرف انفرادی دارو توسط خود بیمار قرار داده‌اند. تحقیقاتی که به چگونگی استفاده از دارو و شرح اثرات استفاده و مفید یا مضر بودن آن پرداخته‌اند، اغلب واجد عنوان پژوهش تحلیلی فارماکوپیدمیولوژیک می‌باشند.

متأسفانه این قسمت از علم پزشکی (یعنی تبعات ناشی از مصرف داروها در جمعیت‌های انسانی یا همان فارماکوپیدمیولوژی)، در حال حاضر در کشور ما به طور رسمی و مدون برای دانشجویان دوره‌ی دکتری عمومی پزشکی تدریس نمی‌گردد و در مقطع دکتری حرفه‌ای رشته‌ی داروسازی نیز فقط در یک مؤسسه (دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)، آن هم به عنوان یک درس دو واحدی اختیاری در طی سال‌های اخیر تدریس شده است؛ در حالی که مدت‌ها است که دانشمندان دارویی به جای سنتز و ارایه‌ی داروهای جدیدتر، به دنبال ایمنی بیشتر داروها هستند و درس فارماکوپیدمیولوژی در دانشکده‌های مختلف پزشکی و داروسازی اروپایی، کانادایی، استرالیایی و آمریکایی برای دانشجویان رشته‌ی پزشکی و مقطع دکتری حرفه‌ای داروسازی در حال تدریس و اجرا می‌باشد. امید است تا با تدبیر عالمانه و درک حکیمانه‌ی تصمیم‌گیرندگان ذی‌ربط آموزش عمومی پزشکی و داروسازی، شاهد توسعه‌ی کمی و کیفی آموزش این شاخه‌ی جوان از علوم پزشکی در سطح کشور و انتفاع جامعه از نتایج سودمند آن باشیم.

سوء استفاده از داروها را در جمعیت‌های بزرگ و در سطح جامعه بررسی می‌نماید. به عبارت دیگر، این علم به جای نشان دادن اثربخشی (Efficacy) در نمونه‌های آماری کنترل شده، اثر مفید (Effectiveness) و نتیجه‌ی به کارگیری داروها را با توصیف و توضیح، پیش‌بینی و کنترل اثر دارو در جمعیت‌های انسانی مورد بحث قرار می‌دهد. به همین دلیل است که از این علم به عنوان پلی بین علوم دارودرمانی و اپیدمیولوژی یاد می‌شود. علم فارماکوپیدمیولوژی با مفاهیم، روش‌ها و کاربری خاص خود، منجر به فهم بهتر شاخص‌های تعیین کننده‌ی وضعیت تجویز و مصرف دارو به خصوص از نظر ایمنی مصرف آن و ارایه‌ی توصیه‌های کاربردی برای سیاست‌گذاران دارویی کشورها می‌گردد (۴).

از سوی دیگر، مطالعات مربوط به استفاده از دارو توسط سازمان بهداشت جهانی تحت عنوان «مطالعه و بررسی عرضه شدن دارو به بازار، توزیع، تجویز و استفاده از داروها در سطح جامعه با تأکید ویژه بر روی نتیجه‌ی پزشکی، اجتماعی و پیامدهای اقتصادی آن» تعریف می‌شود (۵). با توجه به تعریف ارایه شده، چنین مطالعاتی نه تنها شامل مطالعات پزشکی مؤثر بر استفاده از دارو می‌باشد، بلکه تأثیر استفاده از دارو در تمام سطوح احصا شده در تعریف گفته شده را نیز شامل می‌گردد. در این تعریف، به وضوح عوامل غیر داروشناسانه‌ی مؤثر بر استفاده از دارو مانند مؤلفه‌های جامعه‌شناختی و اقتصادی مصرف دارو به رسمیت شناخته شده است. به طور عام و سنتی،

ارجاع: سبزیقبائی میرعلیمحمد. **فارماکوپیدمیولوژی چیست؟** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۵۴-۱۹۵۳

References

1. Rieder M, Ferro A. Adverse drug reactions. Br J Clin Pharmacol 2015; 80(4): 613-4.
2. Waldman SA, Terzic A. Clinical Pharmacology and Therapeutics: the next five years. Clin Pharmacol Ther 2015; 97(1): 2-6.
3. Chen BK, Yang YT. Post-marketing surveillance of prescription drug safety: past, present, and future. J Leg Med 2013; 34(2): 193-213.
4. Wettermark B. The intriguing future of pharmacoepidemiology. Eur J Clin Pharmacol 2013; 69(Suppl 1): 43-51.
5. Tognoni G, Laporte JR. From clinical trials to drug utilization studies. WHO Reg Publ Eur Ser 1993; 45: 23-41.

تهیه کونزوگه‌ی پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A با پروتئین ریکامیننت هپاتیت B به عنوان یک ایمونوژن (تهیه‌ی ایمونوژن از مننژیت و هپاتیت B)

محبوبه محمدامینی^۱، دکتر حجت احمدی^۲، دکتر بهمن تبرایی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A (Neisseria meningitidis capsule یا NMA-CPS) واکنش خوبی برای بیماری مننژیت محسوب می‌شود؛ اما به دلیل این که پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید غیر وابسته به سلول T است و سلول خاخره در پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌گردد، دوز یادآور (Booster dose) آن تأثیری در بالا بردن سطح ایمنی ندارد. در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌ساکارید NMA-CPS به طور کووالان به پروتئین ریکامیننت هپاتیت B (Recombinant hepatitis B surface antigen یا rHbsAg) متصل گردید.

روش‌ها: HbsAg با روش آمیداسیون برای ایجاد یک ایمونوژن دو ظرفیتی مفید و مؤثر، به NMA-CPS کونزوگه شد. کونزوگه و پلی‌ساکارید NMA-CPS به تنهایی به تعدادی خرگوش سفید آزمایشگاهی در سه نوبت به فاصله‌ی ۱۵ روز تزریق گردید و سپس خون‌گیری و جمع‌آوری سرم و بررسی توان باکتری‌کشی سرم با استفاده از روش سرم باکتری‌سیدال (SBA یا Serum bactericidal assay) صورت گرفت.

یافته‌ها: تزریق اول کونزوگه و پلی‌ساکارید تنها، تیترا باکتری‌کشی خوبی را القا نمودند؛ اما کونزوگه در تزریق دوم، تیترا بالاتری را نسبت به پلی‌ساکارید تنها و تزریق اول کونزوگه ایجاد کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دهنده‌ی ایجاد سلول‌های خاخره و تأثیر دوز یادآور در بالا بردن سطح ایمنی می‌باشد؛ در حالی که تیترا باکتری‌کشی پلی‌ساکارید تنها، در تزریق دوم تغییر کمی داشت؛ این یافته به این دلیل است که پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید غیر وابسته به سلول T می‌باشد و سلول خاخره‌ای در پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌گردد.

واژگان کلیدی: پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A، پروتئین ریکامیننت هپاتیت B، ایمونوژن، کونزوگه، روش SBA

ارجاع: محمدامینی محبوبه، احمدی حجت، تبرایی بهمن. تهیه‌ی کونزوگه‌ی پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A با پروتئین ریکامیننت هپاتیت B به عنوان یک ایمونوژن (تهیه‌ی ایمونوژن از مننژیت و هپاتیت B). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۶۴-۱۹۵۵

مقدمه

نایسریا مننژیتیدیس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی مننژیت باکتریایی محسوب می‌شود. این باکتری مانند سایر باکتری‌های گرم منفی با استفاده از یک لایه غشای خارجی حاوی لیپیدها، پروتئین‌های غشای خارجی (Outer membrane proteins یا OMPs) و لیپوپلی‌ساکارید احاطه می‌گردد. علاوه بر این، سوبه‌های بیماری‌زا دارای کپسول پلی‌ساکاریدی چسبیده به غشای خارجی هستند (۸-۱). این باکتری بر اساس تفاوت در ساختار پلی‌ساکارید کپسولی خود به

۱۳ سروتایپ مختلف تقسیم می‌شود که ۵ سروتایپ A، B، C، Y و W135 جزء پاتوژن‌های اصلی انسان به شمار می‌روند. ترکیب شیمیایی کپسول پلی‌ساکاریدی سروتایپ A مننگوکوک، هموپلیمری از N-استیل مانوز آمین فسفات است. کپسول پلی‌ساکاریدی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی مننگوکوک‌ها به شمار می‌رود و سبب جلوگیری از فاگوسیتوز می‌گردد (۲۱-۹).

مزیت واکنش کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A (Neisseria meningitidis capsule یا NMA-CPS)، فرمولاسیون

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲- دانشیار، بخش تهیه واکسن‌های باکتریایی و آنتی‌ژن انستیتو پاستور، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

Email: hojiahmadi@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤو: دکتر حجت احمدی

سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، از این پلیت‌ها کلنی‌های تکی انتخاب گردید و در دو لوله‌ی Mueller hinton agar کشت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. روز بعد، یک لوله جهت کنترل سویه مورد استفاده قرار گرفت؛ به این ترتیب که از آن، لام گرم تهیه شد و گرم منفی بودن و کوکسی بودن باکتری مورد تأیید قرار گرفت. همچنین، با آنتی‌سرم منواسپسیفیک ضد NMA، آزمایش سرولوژی انجام شد و NMA با روش آگلوتیناسیون روی لام مورد تأیید قرار گرفت. با تأیید آزمایش‌هایی که روی لوله‌ی اول انجام گرفته بود، لوله‌ی دوم برای تهیه‌ی بذر جهت کشت در فرمانتور استفاده گردید.

تخلیص پلی‌ساکارید کپسولی طی مراحل مختلف شامل «تهیه‌ی محیط کشت فرانتز در یک لیتر آب مقطر، آماده‌سازی عصاره‌ی مخمر دیالیز شده، تهیه‌ی محیط کشت بذر، تهیه‌ی بذر تلقیحی، آماده‌سازی فرمانتور، کشت و تلقیح بذر به فرمانتور و سپس تخلیص نهایی پلی‌ساکارید کپسولی» در فرمانتور انجام گرفت. تخلیص نهایی پلی‌ساکارید کپسولی نیز با استخراج فنل سرد، اولتراسانتریفوژ و استخراج الکلی صورت گرفت. بعد از استخراج پلی‌ساکارید کپسولی، کونزوگاسیون NMA-CPS با HbsAg انجام شد. در ابتدای اتصال پلی‌ساکارید NMA-CPS با ADH، مشتق NMA-CPS-ADH تشکیل و باعث اتصال آمیدی بین هیدرازید این مشتق با گروه کربوکسیل پروتئین گردید (۶۵-۵۴).

در نهایت بعد از دیالیز کامل، محلول کونزوگه‌ی حاصل در داخل کیسه‌ی دیالیز و در یک ویال ریخته شد و برای خالص‌سازی مولکول‌های کونزوگه از مولکول‌های غیر کونزوگه، از ستون کروماتوگرافی سفاروز 4B-CL عبور داده شد و به این صورت فرکشن‌ها جمع‌آوری گردید. جذب نوری (Optical density یا OD) فرکشن‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت شد و لوله‌هایی که بیشترین جذب را داشتند، به عنوان فرکشن‌های حاوی مولکول کونزوگه جمع‌آوری و با هم ادغام گردید. تعدادی آزمون کنترل کیفی بر روی پلی‌ساکارید کپسولی و مولکول کونزوگه انجام گرفت. برای سنجش مقدار پلی‌ساکارید در واحد وزن محصول، O-استیل نمونه به روش Hestrin و Cabot و Mayer اندازه‌گیری شد (۵۵-۴۷).

مبنای تعیین میزان پلی‌ساکارید در کونزوگه‌ی NMA-CPS-HbsAg، سنجش میزان O-استیل اختصاصی موجود در NMA-CPS نمونه بود. با استفاده از سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) خالص به عنوان استاندارد، آلودگی پروتئین احتمالی در پلی‌ساکارید خالص و مقدار پروتئین ماکرومولکول کونزوگه به روش Lowry اندازه‌گیری شد (۵۲-۴۹).

مشخص و بدون عوارض بودن آن می‌باشد و می‌تواند مصونیت مفید و مؤثری علیه مننژیت ایجاد نماید، اما پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید، غیر وابسته به سلول T است؛ بدین معنی که در پاسخ ایمنی سلول‌خاطره ایجاد نمی‌شود. از این‌رو، دوز یادآور (Booster dose) آن تأثیری در بالا بردن سطح ایمنی و تیتراژ آنتی‌بادی ندارد. بنابراین، در کودکان زیر ۲ سال و خردسالان ایمنی کاملی ایجاد نمی‌کند. برای از بین بردن این کمبود، از برخی پروتئین‌ها به عنوان حامل (Carrier) جهت کونزوگه نمودن پلی‌ساکارید NMA-CPS استفاده می‌شود تا هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولار فعال گردد و کارایی واکسن افزایش یابد. در مطالعه‌ی حاضر از پروتئین ریکامیننت هیاتیت B (Recombinant hepatitis B surface antigen یا rHbsAg) (۳۹-۲۲، ۵) برای این منظور استفاده شد.

امروزه مشخص شده است که مولکول حامل پروتئین سبب فعال شدن لئوسیت‌های T (T-helper) نسبت به ساختار مولکولی (آنتی‌ژنیک) پلی‌ساکارید بعد از ارایه‌ی مولکول کونزوگه به لئوسیت‌های B می‌شود. با اتصال پلی‌ساکارید کپسول باکتری به یک پروتئین ناقل، پاسخ ایمنی وابسته به سلول T در میزبان ایمن شده، القا می‌گردد و خاطره‌ی ایمونولوژیک تماس با ماکرومولکول کونزوگه ایجاد می‌شود (۴۱-۴۰). بسیاری از پلی‌ساکاریدهای باکتریایی در حالت طبیعی فاقد گروه‌های شیمیایی فعال مانند گروه‌های آمینو و یا کربوکسیل هستند و به همین دلیل به طور مستقیم نمی‌توانند به یک حامل پروتئینی به صورت کووالان متصل شوند. در کونزوگاسیون به روش آمیداسیون که یکی از بهترین روش‌های موجود برای کونزوگه کردن ترکیبات پلی‌ساکاریدی به پروتئین می‌باشد، از آدیپیک اسید دی‌هیدرازید (Adipic acid dihydrazide یا ADH) به عنوان یک مولکول فاصله‌گذار ۶ کربنه و از ۱-اتیل-۳-دی‌متیل آمینوپروپیل) کربودیمید [Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodimide] 1 به عنوان عامل جفت‌کننده استفاده می‌شود که سبب اتصال کووالان مشتق ADH با پلی‌ساکارید به حامل پروتئینی به صورت پیوند آمیدی بین هیدرازید پلی‌ساکارید با گروه‌های کربوکسیل پروتئین می‌گردد (۵۱-۴۲).

روش‌ها

برای استخراج پلی‌ساکارید NMA-CPS، سویه‌ی استاندارد (CSBPI, G243) ناسریا مننژیتیدیس سروتایپ A از کلکسیون نگهداری باکتری‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه‌ی آنتی‌ژن مجتمع تولیدی - تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران تهیه و باکتری احیا گردید. پس از سه ساعت، کشت مجدد باکتری روی پلیت Mueller hinton agar انجام گرفت و در دمای ۳۷ درجه‌ی

چمنی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس خارج گردید. تعداد کلنی‌های هر یک از پلیت‌ها شمارش شد و رقت سری می‌پلیت‌هایی که تعداد کلنی‌های رشد یافته در آن‌ها ۵۰ درصد یا کمتر از کلنی‌های پلیت کنترل باکتریایی بود، به عنوان تیتراژ مثبت در نظر گرفته شد. همچنین، ۳ چاهک (کنترل منفی، کنترل مثبت و کنترل باکتریایی) در میکروپلیت به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با انجام تست آگلوتیناسیون روی لام در مجاورت آنتی‌سرم اختصاصی NMA-CPS، باکتری NMA شناسایی و تأیید شد. همچنین، از کلنی‌های تکی ایجاد شده بر روی سطح پلیت Mueller hinton agar، لام تهیه و رنگ‌آمیزی گرم انجام گردید که کوسکی‌های گرم منفی زیر میکروسکوپ، حاکی از وجود نایسیریا مننژتیدیس بود.

پس از تلقیح بذر NMA سویه‌ی CSBPI, G-243 به ۴۰ لیتر محیط فرانتز اصلاح شده‌ی حاوی عصاره‌ی مخمر در فرمانتور، همه‌ی پارامترهای تخمیر در شرایط کنترل شده و مطلوب کشت غوطه‌ور در فرمانتور تا انتهای فاز لگاریتمی رشد تنظیم و هر ۲ ساعت یک بار کنترل شد تا این که سلول‌های باکتری به انتهای فاز لگاریتمی و حداکثر رشد و تکثیر خود رسیدند و سپس پلی‌ساکارید کیسولی نایسیریا مننژتیدیس با روش‌های ذکر شده، تخلیص گردید و کونژوگاسیون پلی‌ساکارید کیسولی و پروتئین ریکامیننت هیاتیت B نیز طبق روش ذکر شده در قسمت‌های قبل انجام گرفت.

ترکیب نهایی نمونه به ستون سفاروز 4B-CL تزریق و OD فرکشن‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فرکشن‌هایی که دارای OD بالاتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بودند، با هم ادغام شدند. با توجه به شکل ۱ و ODهای به دست آمده از فرکشن‌های مختلف، قله‌ی اول مربوط به کونژوگه می‌باشد. در واقع مولکول کونژوگه‌ی گلیکوپروتئینی به دلیل وزن مولکولی بیشتر از هر یک از اجزای آن (پروتئین و پلی‌ساکارید)، سریع‌تر از ستون سفاروز خارج شد. مولکول کونژوگه نشان دهنده‌ی کونژوگه شدن NMA-CPS با حامل پروتئینی (پروتئین ریکامیننت هیاتیت B) است و در ادامه، پروتئین‌های کونژوگه نشده از ستون موجود خارج شدند.

خالص میزان O- استیل در پلی‌ساکارید NMA-CPS و کونژوگه‌ی گلیکوپروتئینی به ترتیب ۲/۷ و ۱/۱۰ میکرومول در هر میلی‌گرم وزن محاسبه شد. با مقایسه‌ی میزان O- استیل اختصاصی در پلی‌ساکارید خالص قبل از انجام عملیات کونژوگاسیون و O- استیل اختصاصی پلی‌ساکارید موجود در کونژوگه‌ی گلیکوپروتئینی، کارایی

جهت ارزیابی ایمونولوژیک و تهیه‌ی سرم‌های ایمن شده در تحقیق حاضر نیز دو گروه دوتایی خرگوش سفید نیوزلندی با وزن ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم انتخاب شد. تزریق آنتی‌ژن‌ها (پلی‌ساکارید کیسولی خالص و کونژوگه‌ی تهیه شده) به صورت داخل عضلانی در روزهای ۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ به منظور بررسی خواص ایمونوژنسیته و انجام روش سرم باکتریسیدال (Serum bactericidal assay یا SBA) انجام شد. آزمون بررسی فعالیت باکتریسیدالی سرم حیوان ایمن شده روشی آزمایشگاهی برای ارزیابی فعالیت باکتری‌کشی سرم است. در واقع، بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی‌بادی‌های تولید شده ضد منگوکوک، مهم‌ترین و دقیق‌ترین آزمون در ارزیابی ایمونولوژیک عفونت‌های ناشی از این باکتری در طی سیر ابتلا به بیماری و یا پس از انجام واکسیناسیون می‌باشد (۵۳-۵۹).

برای انجام تست SBA، ابتدا سویه‌ی استاندارد (CSBPI, G-243) باکتری NMA بر روی لوله‌ی حاوی محیط کشت Müller-Hinton agar کشت شد و بعد از رشد باکتری، لوله‌ی حاوی کلنی باکتری با بافر سالین فسفات (Phosphate buffered saline یا PBS) در pH = ۷/۲ شستشو گردید. سپس، ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون برداشته شد و با استفاده از PBS تا جایی رقیق گردید که کدورتی معادل لوله‌ی شماره‌ی ۳ McFarland (رقت ۱۰^۹) حاصل شود. در مرحله‌ی بعد رقت ۱۰^۳ از نمونه‌ی باکتری تهیه شد. رقت ۱۰^۳ CFU/ml از نمونه‌ی باکتری، برای انجام SBA مناسب می‌باشد (۶۶-۶۰).

سرم‌ها جهت غیر فعال شدن به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بن‌ماری با دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت که این کار باعث از بین رفتن منبع کمپلمان سرم می‌شود. برای هر نمونه‌ی سرم، ۸ چاهک به صورت افقی در نظر گرفته شد و برای منبع کمپلمان خارجی در آزمون نیز از سرم خون بچه‌ی خرگوش ۳ هفته‌ای استفاده شد؛ سپس، اضافه کردن ۵۰ لاندا از تامپون Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) به همه‌ی چاهک‌ها (به جر چاهک‌های اول ردیف عمودی)، اضافه کردن ۱۰۰ لاندا از سرم‌های غیر فعال شده در چاهک‌های ردیف اول عمودی، برداشتن ۵۰ لاندا از چاهک ردیف اول عمودی و اضافه کردن به چاهک دوم و انجام رقیق‌سازی تا انتها، اضافه کردن ۵۰ لاندا تامپون DPBS و پس از آن اضافه کردن ۵۰ لاندا از سوسپانسیون باکتریایی با رقت ۱۰^۳ و ۵۰ لاندا از سرم بچه‌ی خرگوش به عنوان منبع کمپلمان به همه‌ی چاهک‌ها، گذاشتن درب پلیت به مدت ۱ ساعت و قرار دادن در دمای آزمایشگاه به ترتیب انجام گرفت.

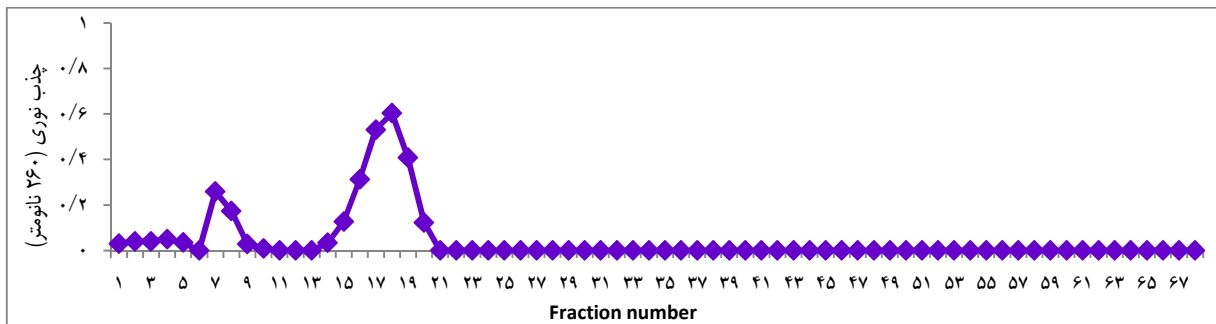
بعد از یک ساعت، ۵۰ لاندا از هر چاهک برداشته شد و به پلیت‌های حاوی Mueller hinton agar منتقل گردید و به صورت

و سوم در بازه‌های زمانی ۱۵ روزه، باعث القای سنتز سطح بالایی از آنتی‌بادی باکتریسیدال در این گروه بر علیه سروتایپ A مننگوکوک و HbsAg می‌شود.

در این تست، رقتی از سرم که در مقایسه با پلیت کنترل باکتریایی، بیش از ۵۰ درصد کلونی‌ها را کشته باشد، به عنوان تیتراژ مثبت در نظر گرفته می‌شود که تعداد کلونی‌ها در پلیت کنترل باکتریایی، ۱۹۰ کلونی بود. با مقایسه‌ی تیتراژ باکتری‌کشی سرم‌ها، مشخص شد که تیتراژ باکتری‌کشی NMA-CPS خالص تا تیتراژ ۱/۸، مثبت شد و اثر باکتری‌کشی داشت و تزریق دوز یادآور با NMA-CPS خالص هم تأثیری در افزایش تیتراژ باکتری‌کشی نشان نداد. میزان تیتراژ باکتری‌کشی کونزوگه‌ی NMA-CPS-HbsAg در تزریق اول، ۱/۶۴ به دست آمد که این میزان نه تنها بیشتر از تیتراژ باکتری‌کشی NMA-CPS خالص در همین تزریق بود، بلکه با تزریق دوز یادآور افزایش یافت و به حدود ۱/۱۲۸ رسید. نتایج حاصل شده نشان دهنده‌ی آن است که کونزوگه‌ی مورد نظر نه تنها ایمنی بیشتری در مرحله‌ی اول نسبت به پلی‌ساکارید تنها ایجاد نمود، بلکه در مرحله‌ی دوم، تزریق تیتراژ آن به نحو قابل ملاحظه‌ای بالاتر رفت که ناشی از پاسخ ایمنی وابسته به سلول T (ایمنی سلولی) می‌باشد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که کونزوگه در دوز یادآور می‌تواند سطح ایمنی بهتری ایجاد نماید.

کونزوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای کپسول NMA-CPS، ۴۰/۷ درصد به دست آمد. فرکشن‌هایی که بیشترین OD را داشتند، با هم ادغام و لیوفیلیزه شدند و میزان پروتئین آن‌ها با استفاده از تست Lowry سنجش گردید. میزان پروتئین پیک یک ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و پیک دو، ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. پیک ۱، پیک کونزوگه و نشان دهنده‌ی کونزوگه شدن NMA-CPS با حامل پروتئینی (پروتئین ریکامیننت هپاتیت B) می‌باشد.

با توجه به میزان پروتئین کونزوگه و میزان پروتئین کل، کارایی کونزوگاسیون ۱۷/۴ درصد برآورد شد و میزان ناخالصی پروتئین در پلی‌ساکارید کپسولی کمتر از ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر گرم پلی‌ساکارید بود که نتیجه قابل قبول می‌باشد. از آنجایی که مهم‌ترین آزمون در ارزیابی‌های ایمونولوژیک واکسن‌های مننگوکوکی، بررسی فعالیت باکتریسیدالی سرم است؛ آزمایش فوق به صورت کمی روی نمونه‌های سرمی حیوان ایمن شده با کونزوگه (NMA-CPS-HbsAg) و NMA-CPS خالص بر علیه سویه‌ی استاندارد (CSBPI, G-243) سروتایپ A و پروتئین ریکامیننت هپاتیت B انجام گرفت. نتایج جداول ۱ و ۲ و شکل ۲ نشان می‌دهد که ماکرومولکول کونزوگه توانایی القای سنتز آنتی‌بادی باکتریسیدالی را در حیوان ایمن شده بعد از اولین تزریق داشت و تزریق یادآور دوم



شکل ۱. طیف جذبی فرکشن‌های مختلف حاصل از ستون سفاروز 4B-CL در طول موج ۲۶۰ نانومتر

جدول ۱. تیتراژ باکتری‌کشی (IgG) Immunoglobulin G تولید شده علیه *Neisseria meningitidis capsul-* و *Neisseria meningitidis capsul-*

hepatitis B surface antigen در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ بر اساس تعداد کلنی

۱/۱۲۸	۱/۶۴	۱/۳۲	۱/۱۶	۱/۸	۱/۴	۱/۲	۱	رقت	تعداد کلنی‌ها
۲۰۹	۱۷۳	۱۴۶	۱۲۰	۷۷	۶۵	۵۰	۴۵	NMA-CPS روز ۱۵	
۱۹۰	۱۶۳	۱۳۵	۱۱۴	۷۳	۶۳	۴۷	۴۲	NMA-CPS روز ۳۰	
۱۸۱	۱۵۳	۱۲۷	۱۱۰	۷۵	۵۵	۳۷	۳۵	NMA-CPS روز ۴۵	
۱۰۰	۸۰	۶۳	۵۰	۳۶	۱۵	۸	۶	NMA-CPS-HbsAg روز ۱۵	
۹۸	۷۱	۴۷	۴۲	۲۶	۹	۶	۵	NMA-CPS-HbsAg روز ۳۰	
۶۰	۳۷	۲۳	۱۸	۵	۵	۳	۱	NMA-CPS-HbsAg روز ۴۵	

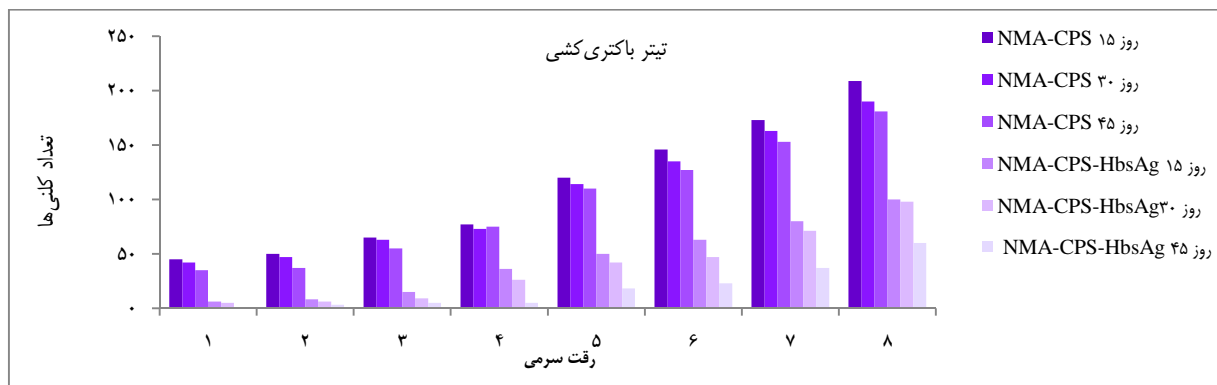
NMA-CPS: *Neisseria meningitidis capsul-*; NMA-CPS-HbsAg: *Neisseria meningitidis capsul-*hepatitis B surface antigen

جدول ۲. تیتراژ باکتری کشی (IgG) Immunoglobulin G تولید شده علیه *Neisseria meningitidis capsul-* و *Neisseria meningitidis capsul-*

hepatitis B surface antigen در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵

رقم	۱	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$
تعداد کلنی‌ها	+	+	+	+	-	-	-	-
NMA-CPS روز ۱۵	+	+	+	+	-	-	-	-
NMA-CPS روز ۳۰	+	+	+	+	-	-	-	-
NMA-CPS روز ۴۵	+	+	+	+	-	-	-	-
NMA-CPS-HbsAg روز ۱۵	+	+	+	+	+	+	+	+
NMA-CPS-HbsAg روز ۳۰	+	+	+	+	+	+	+	+
NMA-CPS-HbsAg روز ۴۵	+	+	+	+	+	+	+	+

NMA-CPS: *Neisseria meningitidis capsul-*; NMA-CPS-HbsAg: *Neisseria meningitidis capsul-hepatitis B surface antigen*



شکل ۲. تیتراژ باکتری کشی (IgG) Immunoglobulin G در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ در روش (Serum bactericidal assay) SBA

رقم‌های ۱ تا ۸ به ترتیب ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴ و ۱/۱۲۸

NMA-CPS: *Neisseria meningitidis capsul-*; NMA-CPS-HbsAg: *Neisseria meningitidis capsul-hepatitis B surface antigen*

پلی‌ساکارید NMA-CPS استفاده می‌شود تا هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولار فعال گردد و کارایی واکسن افزایش یابد (۷۳-۶۰). واکسن کونژوگه با اتصال یک آنتی‌ژن به یک حامل پروتئینی ساخته می‌شود. امروزه مشخص شده است که مولکول حامل، سبب فعال شدن لنفوسیت‌های T نسبت به ساختار مولکولی (آنتی‌ژنیکی) هاپتن (پلی‌ساکارید) بعد از ارزیابی مولکول کونژوگه با کمک لنفوسیت‌های B می‌گردد (۷۹-۷۴).

در تحقیق حاضر از حامل پروتئینی هپاتیت B به عنوان یک پروتئین حامل استفاده شد. همچنین، مقدار پروتئین موجود در کونژوگه‌ی تهیه شده با روش Lowry تعیین گردید و با توجه به این میزان و میزان پروتئین کل، بازدهی کونژوگاسیون بر حسب وزن پروتئین، ۱۷/۴ درصد محاسبه گردید. بازدهی کونژوگاسیون بر حسب وزن پروتئین در مطالعات van der Voort و همکاران (۳۵) و Christodoulides و همکاران (۳۶)، ۳۰ تا ۶۰ درصد تخمین زده شد. بنابراین، نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعات آنان (۳۶-۳۵) تا حدودی مطابقت داشت. همچنین، با مقایسه‌ی میزان O-استیل اختصاصی در پلی‌ساکارید خالص قبل از انجام عملیات کونژوگاسیون

بحث

در دهه‌ی اخیر شایع‌ترین عامل مننژیت باکتریایی، نایسریا مننژیتیدیس بوده است که عوارض متعدد و میزان مرگ و میر بالایی را در مبتلایان به همراه دارد (۱۴، ۱۱). سروتایپ‌های شایع در بروز بیماری شامل A، B، C، Y و W135 می‌باشند. تاکنون واکسن‌های فراوانی برای پیش‌گیری از عفونت‌های مننژیت‌ساز سروتایپ A تولید و به بازار عرضه شده است که از آن جمله می‌توان به واکسن‌های بر پایه‌ی پلی‌ساکارید کپسولی اشاره نمود. مزیت واکسن کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A، فرمولاسیون مشخص و بدون عوارض بودن آن می‌باشد و می‌تواند مصونیت مفید و مؤثری علیه مننژیت ایجاد کند، اما کپسول NMA-CPS و خیلی از باکتری‌های پاتوژن دیگر، ایمنی‌زایی ضعیفی در کودکان و بزرگسالان دارند. پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید غیر وابسته به سلول T است؛ یعنی در پاسخ ایمنی سلول خاطره ایجاد نمی‌شود. از این رو دوز یادآور آن تأثیری در بالا بردن سطح ایمنی و تیتراژ آنتی‌بادی ندارد. بنابراین، در کودکان زیر ۲ سال و خردسالان ایمنی کاملی ایجاد نمی‌کند. پس برای از بین بردن این کمبود، از برخی پروتئین‌ها به عنوان حامل برای کونژوگه نمودن

تحقیقاتی مختلف اشاره نمود که در آن‌ها پروتئین هپاتیت B به عنوان حامل استفاده نشده بود و اغلب حامل‌های پروتئینی مورد استفاده در کونزوگاسیون با پلی‌ساکاریدهای کپسولی، وزن مولکولی بالایی داشتند. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی این موضوع بود که آیا کونزوگاسیون یک پلی‌ساکارید کپسولی دارای پروتئین وزن مولکولی پایین (مانند پروتئین هپاتیت B با وزن مولکولی ۲۴ کیلودالتون)، می‌تواند ایمنی‌زایی مناسبی را ایجاد کند و این کونزوگه قادر است به عنوان یک ایمونوژن دو ظرفیتی مناسب مورد استفاده قرار گیرد؟

هدف از انجام بررسی حاضر، تهیه‌ی ایمونوژن با استفاده از کونزوگه کردن پلی‌ساکارید NMA-CPS به پروتئین HbsAg با پیوند کووالان بود که این محصول بتواند پاسخ ایمنی وابسته به سلول T ایجاد کند (یعنی ایمنی کامل ایجاد نماید) و نیز در جهت ساخت واکسن‌های چند ظرفیتی مورد استفاده قرار گیرد؛ چرا که پاسخ ایمنی پلی‌ساکارید کپسولی به تنهایی غیر وابسته به سلول T است و در کودکان ایمنی ناقصی ایجاد می‌کند. با کونزوگه کردن پروتئین‌هایی از جمله پروتئین هپاتیت B به این پلی‌ساکارید، کپسولی لازم است که این عیب (یعنی وابستگی به سلول‌های T پلی‌ساکارید کپسولی خالص) را از بین ببرد و با توجه به نتایجی که با آزمون‌های انجام شده به دست آمد، این پروتئین می‌تواند یک حامل پروتئینی قابل قبول برای NMA-CPS باشد و ایمنی مناسبی ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

از تمام کارکنان محترم بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه‌ی آنتی‌ژن مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور کرج تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

O- استیل اختصاصی پلی‌ساکارید موجود در کونزوگه‌ی گلیکوپروتئینی، کارایی کونزوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای کپسول NMA-CPS، ۴۰/۷ درصد به دست آمد و این کارایی در تحقیق Jin و همکاران (۶۳) برای پلی‌ساکارید کپسولی سروتایپ A موجود در کونزوگه حدود ۴۰ درصد بر حسب درصد وزن پلی‌ساکارید به دست آمد.

با استفاده از روش SBA مشخص شد که ماکرومولکول کونزوگه‌ی مطالعه‌ی حاضر نسبت به پلی‌ساکارید خالص تنها، تیترا بالاتری از ایمنی را القا می‌کند و می‌تواند به عنوان یک ایمونوژن دو ظرفیتی مورد بررسی و آزمایش‌های بیشتری قرار گیرد. نتایج حاکی از آن بود که کونزوگه‌ی مورد نظر نه تنها ایمنی بیشتری در مرحله‌ی اول نسبت به پلی‌ساکارید تنها ایجاد نمود، بلکه در مرحله‌ی دوم تزریق، تیترا آن به نحو قابل توجهی بالاتر رفت که ناشی از پاسخ ایمنی وابسته به سلول T (ایمنی سلولی) می‌باشد.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که کونزوگه در دوز یادآور می‌تواند سطح ایمنی بهتری را ایجاد نماید. با اطلاعاتی که تاکنون به دست آمده است، در ایران تحقیقاتی روی کونزوگه نمودن پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا مننژیتیدیس به حامل‌های مختلف انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به اقداماتی در جهت تولید و ارزیابی ایمونولوژیک پلی‌ساکارید NMA-CPS در بخش واکسن‌سازی باکتریایی انستیتو پاستور ایران و نیز کارهایی در جهت کونزوگه نمودن پلی‌ساکاریدهای دیگر از جمله پلی‌ساکارید کپسولی Vi سالمونلا تیفی و همچنین، پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا مننژیتیدیس سروتایپ A و C با حامل‌های مختلف مانند آگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا و توکسوئید کزاز و... به صورت طرح‌های

References

1. Adibfar P. Medical microbiology. 3rd ed. Tehran, Iran; Noor-e-Danesh Publications; 1982. p. 480-8. [In Persian].
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, and Adelbergs medical microbiology. 25th ed. New York, NY: McGraw-Hill Publishing Company; 2010.
3. Malekzadeh F. Microbiology. Tehran, Iran: Tehran University Press; 1992. p. 173-82. [In Persian].
4. Namavar H, Zarabi M. Dorland's medical dictionary. Tehran, Iran; Yadvareh-Ketab Publications; 1993. p. 60-95. [In Persian].
5. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. London, UK: Churchill Livingstone; 2004. p. 1079-171, 2498-513.
6. Goldman L, Ausiello D. Cecil textbook of medicine. 22nd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2004. p. 1728-1930.
7. Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. Mechanisms of microbial disease. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p. 535-49.
8. Nester EW, Roberts CE, Pearsal NN, Anderson DG, Nester MT. Microbiology: A human perspective. 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1998. p. 626-49.
9. Collier L, Balows A, Sussman M. Topley and Wilson's, Microbiology and microbial infection: Bacterial infection. 9th ed. New York, NY: Oxford University Press; 1998. p. 299-318, 887-90.
10. George Ray CG, Sherris JC, Ryan KJ. Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2003. p. 873-80.
11. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. N Engl J Med 2001; 344(18): 1378-88.
12. Quagliarello VJ, Scheld WM. Treatment of bacterial meningitis. N Engl J Med 1997; 336(10): 708-16.

13. Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis* 2002; 186(Suppl 2): S225-S233.
14. Jodar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet* 2002; 359(9316): 1499-508.
15. Morley SL, Pollard AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine* 2001; 20(5-6): 666-87.
16. van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1): 144-66, table.
17. Kyaw MH, Clarke SC, Christie P, Jones IG, Campbell H. Invasive meningococcal disease in Scotland, 1994 to 1999, with emphasis on group B meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1834-7.
18. Cartwright K, Noah N, Peltola H. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. *Vaccine* 2001; 19(31): 4347-56.
19. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. p. 927-30.
20. Pollard AJ, Moxon ER. The meningococcus tamed? *Arch Dis Child* 2002; 87(1): 13-7.
21. Winstead JM, McKinsey DS, Tasker S, de Groote MA, Baddour LM. Meningococcal pneumonia: characterization and review of cases seen over the past 25 years. *Clin Infect Dis* 2000; 30(1): 87-94.
22. MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Lake D, Elie C, Carlone G, et al. Immunologic memory 5 years after meningococcal A/C conjugate vaccination in infancy. *J Infect Dis* 2001; 183(1): 97-104.
23. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Baliey and Scott's: Diagnostic microbiology. 11th ed. Philadelphia, PA: Mosbey; 2002. p. 502-11.
24. Macfadin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 333-48.
25. Stuart Walker T. Microbiology. Philadelphia, PA: Saunders; 1998. p. 140-3.
26. Dieckelmann M, Roddam LF, Jennings MP. Purification of post-translationally modified proteins from bacteria: homologous expression and purification of histidine-tagged pilin from *Neisseria meningitidis*. *Protein Expr Purif* 2003; 30(1): 69-77.
27. Tonjum T, Caugant DA, Dunham SA, Koomey M. Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the *Neisseria meningitidis* PilQ protein. *Mol Microbiol* 1998; 29(1): 111-24.
28. Massari P, Ram S, Macleod H, Wetzler LM. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. *Trends Microbiol* 2003; 11(2): 87-93.
29. van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect Immun* 1991; 59(9): 2963-71.
30. Lang H. Outer membrane proteins as surface display systems. *Int J Med Microbiol* 2000; 290(7): 579-85.
31. Jansen C, Wiese A, Reubsæet L, Dekker N, de CH, Seydel U, et al. Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1464(2): 284-98.
32. Sacchi CT, Lemos AP, Popovic T, de Moraes JC, Whitney AM, Melles CE, et al. Serosubtypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: overview and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 2001; 39(8): 2897-903.
33. van den Elsen J, Vandeputte-Rutten L, Kroon J Gros P. Bactericidal antibody recognition of meningococcal Por A by induced fit. *J Bio Chem* 1999; 274(3): 1495-501.
34. Vermont CL, van Dijken HH, Kuipers AJ, van Limpt CJ, Keijzers WC, van der Ende A, et al. Cross-reactivity of antibodies against PorA after vaccination with a meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 2003; 71(4): 1650-5.
35. van der Voort ER, van DH, Kuipers B, van der Biezen J, van der Ley P, Meylis J, et al. Human B- and T-cell responses after immunization with a hexavalent PorA meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 1997; 65(12): 5184-90.
36. Christodoulides M, Rattue E, Heckels JE. Effect of adjuvant composition on immune response to a multiple antigen peptide (MAP) containing a protective epitope from *Neisseria meningitidis* class 1 porin. *Vaccine* 1999; 18(1-2): 131-9.
37. Milagres LG, Gorla MC, Sacchi CT, Rodrigues MM. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with an outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 1998; 66(10): 4755-61.
38. van der Voort ER, van der Ley P, van der Biezen J, George S, Tunnela O, van DH, et al. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7,16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 1996; 64(7): 2745-51.
39. Peeters CC, Rumke HC, Sundermann LC, Rouppe van der Voort EM, Meulenbelt J, Schuller M, et al. Phase I clinical trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 1996; 14(10): 1009-15.
40. Wright JC, Williams JN, Christodoulides M, Heckels JE. Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 2002; 70(8): 4028-34.
41. van der Ley P, Poolman JT. Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the class 1 outer membrane protein. *Infect Immun* 1992; 60(8): 3156-61.
42. Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J, Wedge E, Rosenqvist E. PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine* 2001; 19(11-12): 1526-33.
43. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B,

- Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* 1999; 281(16): 1520-7.
44. Henderson B, Wilson M, McNab R, Lax AJ. Cellular microbiology: Bacteria- Host interactions in health and disease. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2000. p. 191-271, 311-55.
 45. Mirlashari MR, Hoiby EA, Holst J, Lyberg T. Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*: effects on cytokine production in human whole blood. *Cytokine* 2001; 13(2): 91-7.
 46. Pollard AJ, Frasca C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2001; 19(11-12): 1327-46.
 47. Al'Aldeen AA, Cartwright KA. *Neisseria meningitidis*: vaccines and vaccine candidates. *J Infect* 1996; 33(3): 153-7.
 48. Rappuoli R, Normark S, Cossart PF. Cellular microbiology. Washington, DC: American Society Microbiology; 2000. p. 68-94, 291-310.
 49. Fukasawa LO, Gorla MC, Lemos AP, Schenkman RP, Brandileone MC, Fox JW, et al. Immune response to native NadA from *Neisseria meningitidis* and its expression in clinical isolates in Brazil. *J Med Microbiol* 2003; 52(Pt 2): 121-5.
 50. Martin D, Cadieux N, Hamel J, Brodeur BR. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. *J Exp Med* 1997; 185(7): 1173-83.
 51. Cadieux N, Plante M, Rioux CR, Hamel J, Brodeur BR, Martin D. Bactericidal and cross-protective activities of a monoclonal antibody directed against *Neisseria meningitidis* NspA outer membrane protein. *Infect Immun* 1999; 67(9): 4955-9.
 52. Moe GR, Tan S, Granoff DM. Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun* 1999; 67(11): 5664-75.
 53. Moe GR, Zuno-Mitchell P, Lee SS, Lucas AH, Granoff DM. Functional activity of anti-*Neisseria* surface protein A monoclonal antibodies against strains of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Infect Immun* 2001; 69(6): 3762-71.
 54. Turner PC, Thomas CE, Stojiljkovic I, Elkins C, Kizel G, Ala'Aldeen DA, et al. *Neisseria* TonB-dependent outer-membrane proteins: detection, regulation and distribution of three putative candidates identified from the genome sequences. *Microbiology* 2001; 147(Pt 5): 1277-90.
 55. Peak IR, Srikhanta Y, Dieckelmann M, Moxon ER, Jennings MP. Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28(4): 329-34.
 56. Bhattacharjee AK, Moran EE, Ray JS, Zollinger WD. Purification and characterization of H.8 antigen from group B *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1988; 56(4): 773-8.
 57. Masignani V, Comanducci M, Giuliani MM, Bambini S, Adu-Bobie J, Arico B, et al. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J Exp Med* 2003; 197(6): 789-99.
 58. Welsch JA, Moe GR, Rossi R, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Granoff DM. Antibody to Genome-Derived *Neisseria* Antigen 2132, a *Neisseria meningitidis* Candidate Vaccine, Confers Protection against Bacteremia in the Absence of Complement-Mediated Bactericidal Activity. *Journal of Infectious Diseases* 2003; 188(11): 1730-40.
 59. Ruggenberg JU, Pollard AJ. Meningococcal vaccines. *Paediatr Drugs* 2004; 6(4): 251-66.
 60. Robbins J B, Hill J C, Sadoff J C. Seminars in infectious diseases IV. Bacterial vaccines. New York, NY: Thieme-Stratton Corp; 1982. p. 242-75.
 61. Gudlavalleti SK, Datta AK, Tzeng YL, Noble C, Carlson RW, Stephens DS. The *neisseria meningitidis* serogroup a capsular polysaccharide o-3 and o-4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 2004; 279(41): 42765-73.
 62. Jacobsson S, Issa M, Unemo M, Backman A, Molling P, Sulaiman N, et al. Molecular characterisation of group A *Neisseria meningitidis* isolated in Sudan 1985-2001. *APMIS* 2003; 111(11): 1060-6.
 63. Jin Z, Chu C, Robbins JB, Schneerson R. Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice. *Infect Immun* 2003; 71(9): 5115-20.
 64. Berkin A, Coxon B, Pozsgay V. Towards a synthetic glycoconjugate vaccine against *Neisseria meningitidis* A. *Chemistry* 2002; 8(19): 4424-33.
 65. Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for Meningococcal Disease. *Vaccine* 1995; 13(9): 821-9.
 66. Vermont C, van den Dobbelen G. *Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34(2): 89-96.
 67. Peltola H. Meningococcal vaccines. Current status and future possibilities. *Drugs* 1998; 55(3): 347-66.
 68. Diaz RJ, Ootschoorn IM. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4): 559-75.
 69. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Vaccines. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Saunders; 2004. p. 959-87.
 70. Martin SL, Borrow R, van der Ley P, Dawson M, Fox AJ, Cartwright KA. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 2000; 18(23): 2476-81.
 71. Granoff DM, Kelsey SK, Bijlmer HA, van AL, Dankert J, Mandrell RE, et al. Antibody responses to the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B in patients with meningococcal disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(5): 574-82.
 72. Lively MR, Roberts SC, Shepherd WM, Esdaile J, Wang Z, Cleverly A, et al. Immunogenicity in adult males of a *Neisseria meningitidis* group B vaccine composed of polysaccharide complexed with outer membrane proteins. *Vaccine* 1991; 9(1): 60-6.

73. Shin JS, Lin JS, Anderson PW, Insel RA, Nahm MH. Monoclonal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* group B polysaccharide and their peptide mimotopes. *Infect Immun* 2001; 69(5): 3335-42.
74. Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol* 1987; 138(12): 4402-7.
75. Upreti RK, Kumar M, Shankar V. Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* 2003; 3(4): 363-79.
76. Zinsser H, Joklik WJ. *Zinsser microbiology*. 20th ed. New York, NY: Appleton and Lange; 1988. p. 441-63
77. Rahman MM, Kolli VS, Kahler CM, Shih G, Stephens DS, Carlson RW. The membrane phospholipids of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* as characterized by fast atom bombardment mass spectrometry. *Microbiology* 2000; 146 (Pt 8): 1901-11.
78. Plested JS, Harris SL, Wright JC, Coull PA, Makepeace K, Gidney MA, et al. Highly conserved *Neisseria meningitidis* inner-core lipopolysaccharide epitope confers protection against experimental meningococcal bacteremia. *J Infect Dis* 2003; 187(8): 1223-34.
79. Schwartz B, Moore PS, Broome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2(Suppl): S118-S124.

Preparation of Conjugated Neisseria Meningitidis Type A Capsular Polysaccharide with Recombinant Protein of Hepatitis B as an Immunogen

Mahboobeh Mohamadamini MSc¹, Hojat Ahmadi MD², Bahman Tabaraie MD³

Original Article

Abstract

Background: Polysaccharide vaccines are effective in individuals from about the two years of age but, as they elicit T-cell independent immunity, they are not effective in younger children. In contrast, polysaccharide-protein conjugates are shown to be highly immunogenic in infants and induce T-cell dependent immunity.

Methods: In this study, capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis type A (NMA-CPS) was attached to recombinant protein of hepatitis B surface antigen (rHbsAg) covalently using amidation method. Immunization was done, choosing 2 groups of rabbits. Pure NMA-CPS and conjugated molecule were injected to groups 1 and 2, with a 15-day interval, intramuscularly. The bleeding was performed at days 0, 15, 30, 45 and titers of sera were measured via serum bactericidal assay.

Findings: Polysaccharide bactericidal titer on days 15, 30 and 45 was almost identical and there was no increase in titer. But, in the first injection of the conjugate, the titer was much more (about twice of purified polysaccharide), and in the second injection, increased.

Conclusion: Results display that conjugated molecules cause more immunity than pure capsular polysaccharide, and can stimulate cellular immunity.

Keywords: Neisseria meningitidis type A, Conjugate, Immunogen, Recombinant protein, Hepatitis B, Serum bactericidal assay

Citation: Mohamadamini M, Ahmadi H, Tabaraie B. **reparation of Conjugated Neisseria Meningitidis Type A Capsular Polysaccharide with Recombinant Protein of Hepatitis B as an Immunogen.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(359): 1955-64

1- Department of Microbiology, School of Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Associate Professor, Department of Bacterial Vaccine and Antigen Production, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Microbiology, School of Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Corresponding Author: Hojat Ahmadi MD, Email: hojiahmadi@yahoo.com

طراحی روش جدید محاسبه پهنای متوسط لاین در تصاویر پالس فیلد ژل الکتروفورز جهت آشکارسازی و استخراج لاین

محمد رضایی^۱، دکتر محمود امیری^۲، دکتر پرویز مهاجری^۳، دکتر منصور رضایی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مقاله حاضر روش جدیدی را برای محاسبه پهنای متوسط لاین در تصاویر پالس فیلد ژل الکتروفورز (Pulsed field gel electrophoresis) یا PFGE جهت آشکارسازی و استخراج لاین‌ها نشان داد. اگرچه مطالعاتی پیرامون آشکارسازی لاین‌ها بر اساس پروچکشن- پروفایل (Projection profiles) گزارش شده، اما هنوز یک روش اتوماتیک با خطای کم انجام نگرفته است. پهنای متوسط لاین، مهم‌ترین پارامتر برای انجام اتوماتیک پردازش تصاویر PFGE می‌باشد. این پژوهش با هدف استفاده از روش چگالی طیف توان برای محاسبه پهنای متوسط لاین انجام شد.

روش‌ها: ابتدا بر اساس چگالی طیف توان، پردازش تصاویر PFGE انجام گردید. الگوریتم پیشنهادی با استفاده از ۱۰ تصویر PFGE بهبود داده شد و سپس برای تست از ۲۰ تصویر دیگر استفاده گردید که در مجموع شامل ۳۰۰ لاین بود. تصاویر با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز میدان پالسی مدل Bio-Rad واقع در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تهیه شد.

یافته‌ها: استفاده از روش چگالی طیف توان در مقایسه با روش تقاطع خط افقی، ۹۹/۶ درصد از خطای آشکارسازی مراکز لاین را کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که پارامتر پهنای متوسط لاین در چندین مرحله برای آشکارسازی و استخراج لاین‌ها مورد استفاده قرار گرفت، استفاده از روش چگالی طیف توان می‌تواند فرایند استخراج لاین را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: چگالی طیف توان، پهنای متوسط لاین، تصاویر (PFGE) Pulsed field gel electrophoresis

ارجاع: رضایی محمد، امیری محمود، مهاجری پرویز، رضایی منصور. طراحی روش جدید محاسبه پهنای متوسط لاین در تصاویر پالس فیلد ژل

الکتروفورز جهت آشکارسازی و استخراج لاین. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۶۵-۱۹۷۲

مقدمه

تصاویر PFGE حاوی نوارهای عمودی هستند که به آن‌ها لاین گفته می‌شود. هر لاین شامل گروهی از قطعات DNA می‌باشد که به صورت باندهای افقی و با پهنای ثابتی ظاهر می‌شود (۲). ظهور فن‌آوری تصاویر دیجیتال، روش مستقیمی را برای تهیه تصاویر ژل الکتروفورز در یک فرمت مشخص جهت آنالیز فراهم می‌آورد (۳). تصاویر ژل الکتروفورز دیجیتالی به طور گسترده‌ای برای استخراج اطلاعات ارزشمند از مواد بیولوژیک در بسیاری از کاربردهای زیست‌شناسی مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). به عنوان مثال، برای یافتن رابطه‌ی بین یک نمونه بیولوژیک ناشناخته و یک گروه

از محدودیت‌های ژل الکتروفورز معمولی، عدم توانایی در جداسازی قطعات بزرگ DNA می‌باشد. در سال ۱۹۸۴ تکنیکی ارایه شد که بر این مشکل غلبه کرد. در این تکنیک با تغییر دادن دوره‌ای جهت جریان الکتریکی، قطعات بزرگ DNA قابل جداسازی شدند. امروزه این تکنیک به ژل الکتروفورز میدان پالسی (PFGE) یا Pulsed field gel electrophoresis مشهور است و یکی از روش‌های رایج به شمار می‌رود. تصاویر PFGE می‌تواند برای تیپ‌بندی و مطالعات اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد (۱).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده پزشکی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۴- دانشیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات توسعه اجتماعی و ارتقای سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

سیگنال حاصل از پروجکشن - پروفایل و یافتن فاصله‌ی نقاط قطع هر لاین به عنوان پهنای آن و سپس به دست آوردن میانگین مقادیر پهنای تمامی لاین‌ها می‌باشد (۱۱).

با توجه به این که روش مذکور نمی‌تواند تخمین دقیقی از پهنای متوسط لاین به دست آورد، در مطالعه‌ی حاضر روش جدیدی برای محاسبه‌ی پهنای متوسط لاین ارایه گردید که اساس آن، چگالی طیف توان سیگنال حاصل از پروجکشن - پروفایل می‌باشد. اساس کار بدین‌گونه است که پروجکشن - پروفایل بر روی تصویر PFGE انجام می‌گیرد و سپس چگالی طیف توان سیگنال به دست آمده، محاسبه خواهد شد. دومین فرکانسی که دارای چگالی توان بیشتری باشد، به عنوان فرکانس متناظر با پهنای متوسط لاین در نظر گرفته می‌شود. این پژوهش در چهار بخش ارایه شد. در بخش اول نحوه‌ی محاسبه‌ی چگالی طیف توان توضیح داده شد و در بخش دوم نیز پهنای متوسط لاین بر اساس چگالی طیف توان محاسبه گردید. همچنین، برای ارزیابی روش محاسبه‌ی پهنای لاین، الگوریتم آشکارسازی لاین مطابق با فلوجارت نشان داده شده در شکل ۱ انجام گرفت. تصاویر PFGE بر روی پایگاه داده‌ها در بخش سوم ارایه شد.

روش‌ها

الگوریتم آشکارسازی لاین در دو بخش محاسبه‌ی پهنای متوسط لاین و پردازش‌های محلی تصویر انجام می‌شود که در شکل ۱ نشان داده شده است. محاسبه‌ی پهنای متوسط لاین بر اساس چگالی طیف توان بر روی سیگنال پروجکشن - پروفایل به دست آمده از کل تصویر انجام می‌گیرد. سپس، تصویر کلی به تصاویر کوچک تری بخش‌بندی می‌شوند تا مراکز لاین‌ها در هر زیرتصویر مشخص گردد. پیش از انجام هر یک از مراحل با استفاده از یک فیلتر میانه‌ی تطبیقی (۱۴-۱۲)، نویز سیگنال برطرف می‌شود. در شکل ۱ نمای کلی پردازش و نحوه‌ی استفاده از پارامتر پهنای متوسط لاین آمده است.

۱- تخمین چگالی طیف توان

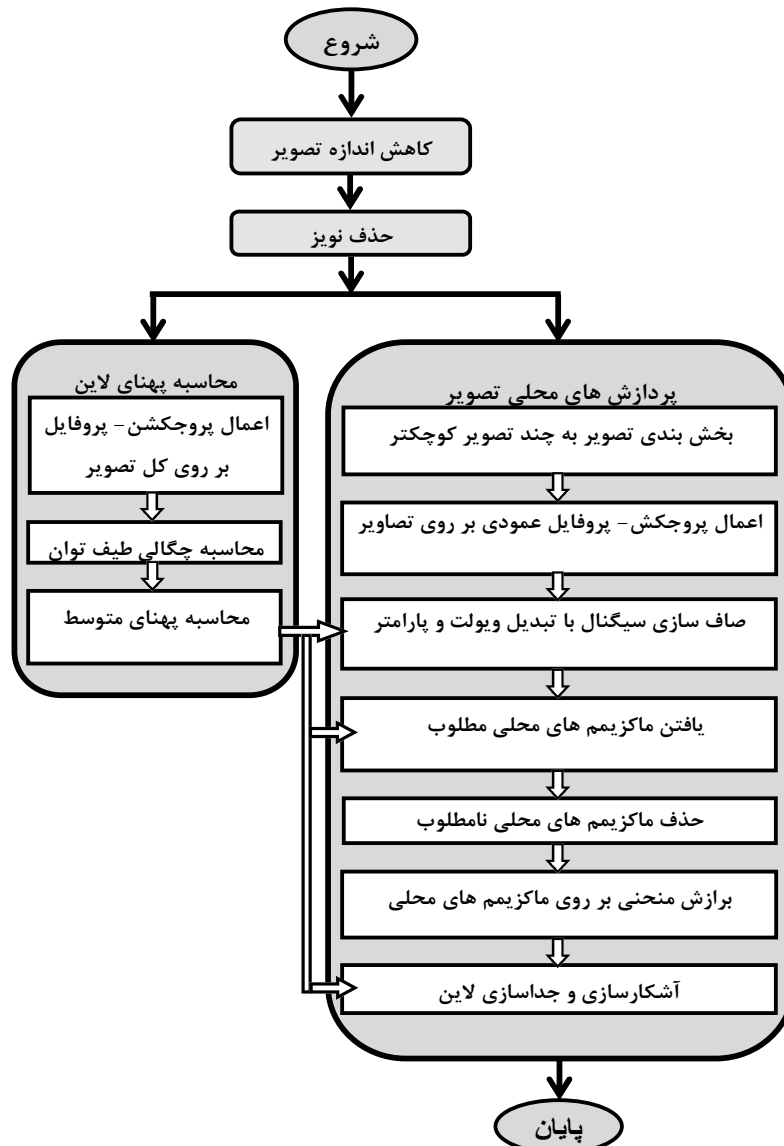
تخمین چگالی طیف توان یکی از روش‌های تعیین فرکانس‌های یک سیگنال می‌باشد. به طور کلی می‌توان مقیاس تغییرات فضایی را با بررسی تغییرات در میدان فرکانس و با استفاده از تحلیل سری‌های زمانی مشخص کرد. استفاده از تبدیل Fourier، روش استاندارد برای تحلیل این سری‌ها است. از آن‌جا که یک سری زمانی می‌تواند هم در یک میدان فیزیکی (زمان - مکان) و هم در میدان فرکانس به صورت یک طیف مورد بررسی قرار گیرد، با استفاده از تبدیل Fourier می‌توان داده‌های مکانی از حوزه‌ی فضا را به حوزه‌ی فرکانس انتقال داد (۱۵). در این مطالعه از ضرایب تبدیل Fourierی سریع (۱۶) برای تخمین چگالی طیف توان استفاده شد.

بیولوژیک شناخته شده، الگوی DNA آن‌ها مقایسه می‌گردد (۲). به هر حال، آنالیز و ارزیابی دستی تصاویر کار یکنواخت و خسته کننده‌ای است و خطای انسانی را به همراه دارد (۵-۶).

امروزه پردازش و آنالیز این تصاویر با استفاده از کامپیوتر صورت می‌گیرد (۳). از جمله کارهایی که می‌توان انجام داد، فرایند استخراج لاین و مکان‌یابی باندهای هر لاین می‌باشد. عوامل متعددی مانند بار الکتریکی ذرات، دما و pH محیط روی کیفیت تصویر ایجاد شده تأثیر می‌گذارند. بنابراین، لازم است پردازش‌های صحیحی روی تصاویر انجام شود تا فرایند استخراج لاین و مکان‌یابی باندها به درستی صورت گیرد. توجه به این نکته ضروری است که هدف اصلی از پردازش و آنالیز این تصاویر، مکان‌یابی باندها و مقایسه‌ی لاین‌ها بر اساس مکان باندها می‌باشد؛ اما برای این هدف لازم است ابتدا لاین‌ها از تصویر استخراج شود و در نهایت پردازش و آنالیز به صورت جداگانه برای هر لاین صورت گیرد. از آن‌جا که تصاویر PFGE مانند تصاویر ژل الکتروفورز PCR (Polymerase chain reaction) می‌باشد، می‌توان از مطالعات انجام شده بر روی این دسته از تصاویر نیز بهره‌مند شد. بنابراین، روش‌های متعددی برای حل مشکل آنالیز بصری که زمان‌بر و نادرست بود، پیشنهاد گردید (۷).

اولین مرحله از پردازش تصاویر PFGE، آشکارسازی و استخراج لاین می‌باشد که به آن ردیابی لاین گفته می‌شود (۸). با توجه به این که میزان صحت مرحله‌ی آشکارسازی باند، به طور کامل وابسته به میزان صحت این مرحله می‌باشد، ضروری است از تکنیک‌هایی که باعث بهبودی فرایند آشکارسازی لاین می‌شود، استفاده گردد. در تحقیقات اکبری و همکاران (۷) و Wong و همکاران (۸) روش نیمه‌خودکار آشکارسازی لاین ارایه شد. در این روش‌ها، کاربر باید تعداد لاین‌های موجود در تصویر را به صورت دستی وارد کند. در این میان، نرم‌افزاری تجاری نیز طراحی گردید (۳). با مشخص شدن تعداد لاین‌ها می‌توان تخمینی از پهنای متوسط آن‌ها داشت که برای انجام مراحل بعدی آشکارسازی لاین مانند صاف‌سازی سیگنال، حذف مراکز نامطلوب آشکار شده‌ی لاین‌ها و اتصال مراکز هر لاین در تمام زیرتصویرها بسیار ضروری می‌باشد. اغلب روش‌های اتوماتیک پیشنهاد شده برای آشکارسازی لاین بر اساس پروجکشن - پروفایل (Projection profiles) بر روی محور x ارایه شده است (۹).

جهت صاف‌سازی سیگنال حاصل از پروجکشن - پروفایل، می‌توان از تبدیل موجک (Wavelet) استفاده کرد (۱۰). برای انتخاب مناسب پارامترهای موجک نیز ضروری است که از پارامتر پهنای متوسط لاین استفاده گردد. یکی از روش‌هایی که تاکنون برای تخمین پهنای متوسط لاین استفاده شده است، تقاطع دادن یک خط افقی با



شکل ۱. نمای الگوریتم پیشنهاد شده برای آشکار سازی و استخراج لاین

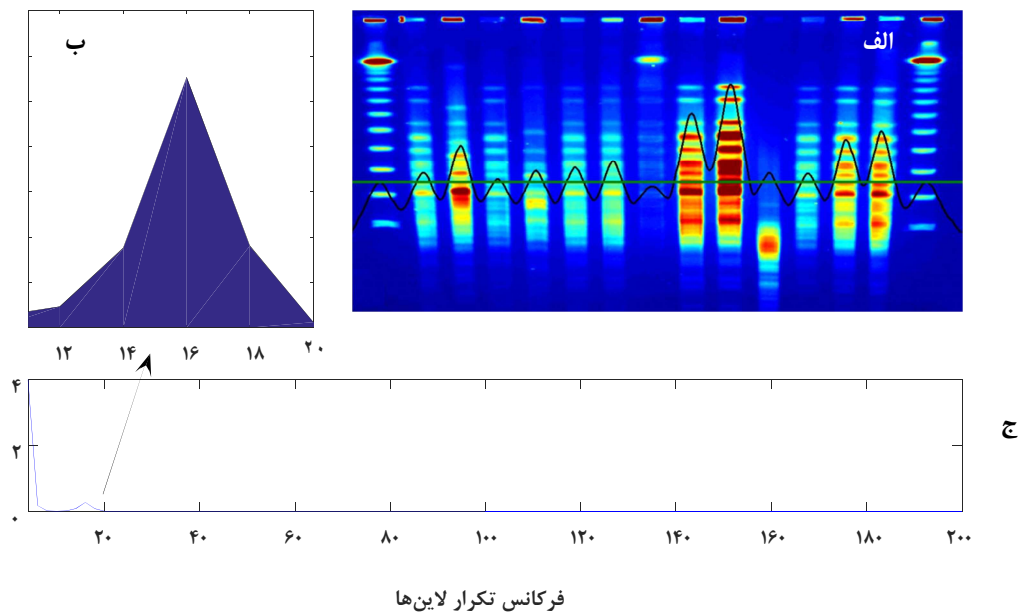
به دست آمده محاسبه شد (شکل ۲، قسمت ب). دو فرکانس اصلی به صورت چگالی طیف توان ظاهر شد. اولین فرکانس که دارای توان بیشتری می باشد، مربوط به پس زمینه و فرکانس دوم، نشان دهنده‌ی پهنای لاین‌ها است (شکل ۲، قسمت ج). هرچه فرکانس مربوط بزرگ تر باشد، پهنای لاین کم تر خواهد بود. بنابراین، پهنای لاین رابطه‌ی معکوسی با فرکانس آشکار شده دارد که معادله‌ی آن در ادامه آمده است.

$$w = \frac{1}{f} * (\text{length of projection profiles}) \quad (1) \text{ معادله‌ی ۱}$$

در معادله‌ی ۱، w پهنای لاین و f فرکانس آشکار شده می باشد.

۲- محاسبه‌ی پهنای متوسط لاین

پروجکشن- پروفایل روی محور x تخمینی از پهنای لاین‌ها را فراهم می کند. پروجکشن- پروفایل همان تبدیل اطلاعات دو بعدی به اطلاعات تک بعدی می باشد. در این مطالعه شدت پیکسل‌های هر ستون از تصویر با یکدیگر جمع می شود و سیگنالی با تعداد نمونه‌های برابر و تعداد ستون‌های تصویر ارایه می دهد. در تصاویر PFGE مقادیر سیگنال حاصل از پروجکشن- پروفایل در طول لاین‌ها بزرگ تر از مقادیر آن در طول فواصل بین دو لاین است. دلیل آن هم وجود باندهایی در لاین‌ها می باشد که دارای مقادیر شدت پیکسل بیشتری هستند (شکل ۲، قسمت الف). بنابراین، ابتدا سیگنال پروجکشن- پروفایل صاف سازی و سپس چگالی طیف توان سیگنال



شکل ۲. نحوه‌ی محاسبه‌ی پهنای متوسط لاین با روش چگالی طیف توان

قسمت الف: نمای PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) همراه سیگنال پروجکشن- پروفایل و خط افقی مورد استفاده در روش تقاطع خط افقی، قسمت ب: سیگنال چگالی طیف توان مربوط به سیگنال پروجکشن- پروفایل و قسمت ج: بزرگنمایی چگالی طیف توان سیگنال پروجکشن- پروفایل در ناحیه‌ی فرکانسی متناظر با پهنای متوسط لاین

برای انتخاب بهینه‌ی پارامترهای موجک لازم است که از مقدار پهنای متوسط لاین استفاده شود. در مرحله‌ی بعدی، مراکز لاین واقع در موقعیت مشابه دسته‌بندی می‌شوند. قابل توجه است که دقت بودن مقدار پهنای متوسط لاین در این مرحله، باعث کاهش خطا در آشکارسازی لاین خواهد شد.

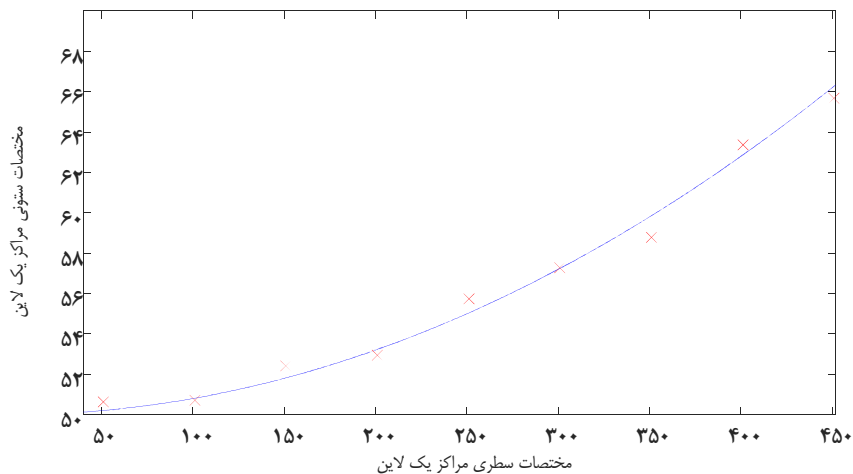
همان گونه که پیش تر گفته شد، برای شناسایی مراکز لاین، از مقدار پهنای متوسط استفاده شد. این تکنیک تا حدودی باعث حذف مراکز لاین کاذب می‌شود. علاوه بر این، از برازش مسیر آشکار شده برای لاین‌ها نیز جهت کاهش خطا استفاده گردید (شکل ۳). بدین منظور مراکز لاین واقع در یک موقعیت عمودی مشابه، در یک بردار و تمامی بردارهای ایجاد شده در یک ماتریس سلولی ذخیره می‌گردد. دلیل این که به جای استفاده از یک ماتریس دو بعدی، از یک بردار و یک ماتریس سلولی استفاده شد، این است که احتمال دارد تعداد مراکز لاین آشکار شده‌ی هر لاین با یکدیگر متفاوت باشد. بعد از ایجاد ماتریس مورد نظر و با استفاده از کد برنامه‌ای، مسیر تمام لاین‌ها برازش گردید و در نهایت با استفاده از تابع به دست آمده، مسیر لاین در طول هر لاین شبیه سازی گردید. حال با استفاده از مسیر شبیه سازی شده، لاین مورد نظر از تصویر اصلی استخراج شد.

۳- پردازش محلی تصاویر

بعد از این که پهنای لاین‌ها مشخص شد، پردازش‌های بعدی به صورت محلی بر روی تصویر انجام می‌شود که شامل چند مرحله است. ابتدا تصویر به چند زیرتصویر با پهنای مشخص، بخش بندی و سپس حداکثرهای محلی سیگنال گرفته شده‌ی هر یک از زیرتصاویر محاسبه می‌گردد. برای جلوگیری از آشکارسازی حداکثرهای نامطلوب محلی، کد برنامه‌ای با قابلیت آشکارسازی حداکثرها و با در نظر گرفتن پهنای قله‌ها و شیب قله مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین، با استفاده از این روش، حداکثرهای محلی که مربوط به قله‌های دارای اختلاف پهنای زیاد با پهنای متوسط لاین‌ها باشد، آشکار نمی‌شود. سرانجام با برازش منحنی مراکز لاین واقع در موقعیت عمودی مشابه، مسیر هر لاین آشکار می‌شود.

آشکارسازی مراکز لاین در هر زیرتصویر بر اساس سیگنال

پروجکشن- پروفایل: در این مرحله، مراکز لاین‌ها در تمامی زیرتصاویرها به دست می‌آید. بدین منظور، ابتدا با استفاده از تبدیل موجک (۱۷)، سیگنال حاصل از پروجکشن- پروفایل در هر زیرتصویر پیش پردازش می‌شود و سپس با استفاده از کد برنامه‌ی آشکارسازی حداکثرهای محلی، مراکز لاین‌ها محاسبه خواهد شد. در مطالعه‌ی حاضر از تبدیل موجک ۷ دسی‌بل با ۶ سطح استفاده گردید.



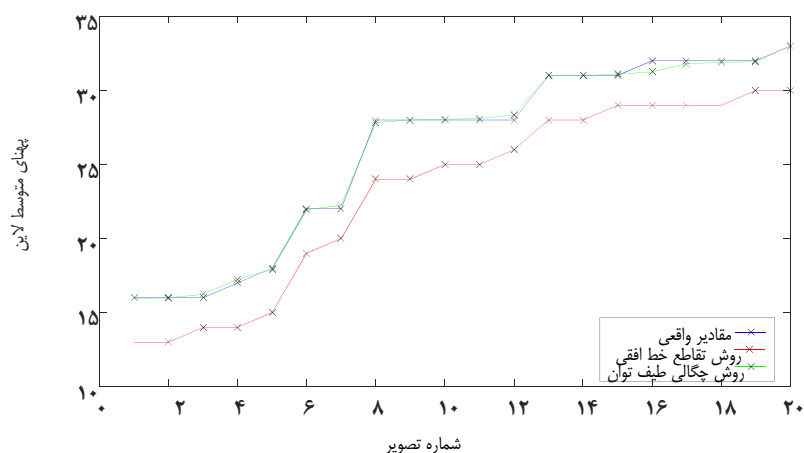
شکل ۳. مراکز آشکار شده‌ی یک لاین استخراج شده از تصویر PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) و برازش منحنی مراکز به دست آمده نقاط قرمز رنگ، مراکز آشکار شده‌ی هر زیر تصویر است که با مقداری خطا آشکار شده‌اند و برازش منحنی باعث کاهش این خطا می‌شود.

۴- مواد

برای تست الگوریتم طراحی شده، از ۳۰ تصویر PFGE که در مجموع شامل ۴۵۰ لاین بود، استفاده شد. تمام تصاویر با استفاده از دستگاه PFGE مدل BIO-RAD واقع در آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تهیه گردید. تصاویر با فرمت TIF و در اندازه ی 500×500 پیکسل ذخیره شد. تعداد لاین در هر تصویر از ۱۴ تا ۱۸ لاین متغیر بود. ۳۰ تصویر (۱۰ تصویر برای آموزش و ۲۰ تصویر برای تست) به صورت تصادفی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، همه‌ی الگوریتم‌های طراحی شده در نرم‌افزار Matlab نسخه‌ی R2010a پیاده‌سازی و اجرا گردید.

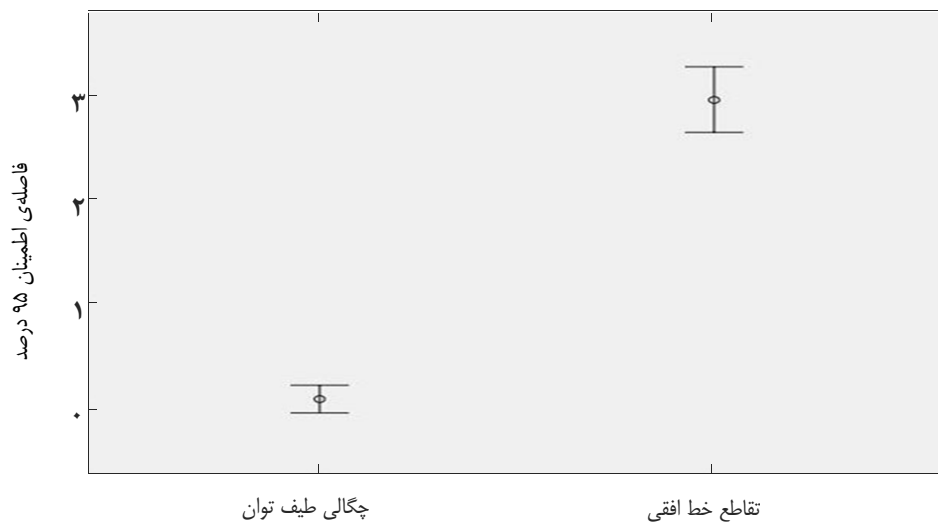
یافته‌ها

الگوریتم پردازشی در دو حالت بر روی تصاویر اجرا شد. در حالت اول از روش تقاطع خط افقی با سیگنال حاصل از پروجکشن-پروفایل و میانگین گیری از مقادیر پهنای به دست آمده از هر لاین و در حالت دوم از روش چگالی طیف توان که در مطالعه‌ی حاضر طراحی شد، استفاده گردید. در دو حالت مورد نظر، مقدار پهنای متوسط لاین برای تمامی تصاویر محاسبه و با مقدار واقعی آن‌ها مقایسه شد. جهت ارزیابی الگوریتم‌ها و محاسبه‌ی خطای هر یک از روش‌ها، روش میانگین مربعات خطا مورد استفاده قرار گرفت (۱۸). در شکل ۴ نتایج این بخش از الگوریتم ارائه شده است.



شکل ۴. پهنای متوسط لاین در ۲۰ تصویر PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) با تعداد لاین متفاوت

خط آبی رنگ مربوط به پهنای متوسط و واقعی لاین و خط سبز رنگ پهنای متوسط لاین در تصاویر را نشان می‌دهد که با استفاده از روش الگوریتم پیشنهادی محاسبه شد. همچنین، خط قرمز رنگ پهنای متوسط لاین به دست آمده با استفاده از روش تقاطع خط افقی در ۲۰ تصویر PFGE را نشان می‌دهد.



شکل ۵. فاصله‌ی اطمینان میانگین اختلاف مقادیر پهنای متوسط لاین در دو روش چگالی طیف توان و تقاطع خط افقی با مقادیر واقعی پهنای لاین

طراحی و تست گردید. الگوریتم‌های پیشنهاد شده‌ی این پژوهش چند ویژگی منحصر به فرد داشت که در ادامه به آن‌ها اشاره شده است. با توجه به کاربرد گسترده‌ی موجک در صاف‌سازی سیگنال، در مطالعه‌ی حاضر نیز با استفاده از تبدیل موجک، سیگنال پروجکشن-پروفایل صاف‌سازی شد. بدین منظور از پارامتر پهنای متوسط لاین‌ها جهت انتخاب بهینه‌ی پارامترهای موجک مورد نظر استفاده گردید. پیش‌تر از روش میانگین‌گیری برای صاف‌سازی استفاده می‌شد (۷). در تحقیق Park و همکاران به منظور انتخاب مناسب پنجره‌ی میانگین‌گیری، پارامتر پهنای متوسط لاین‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). تشخیص دقیق این پارامتر در این مرحله حایز اهمیت است. اگر بنا به هر دلیلی محاسبه‌ی این پارامتر همراه با خطای زیاد باشد، تعدادی از حداکثرهای مطلوب محلی سیگنال پروجکشن-پروفایل در حین صاف‌سازی از بین خواهند رفت. با توجه به این که مراکز لاین‌ها در هر زیرتصویر متناظر با حداکثرهای محلی هستند، عدم آشکارسازی آن‌ها باعث آشکارسازی غیر صحیح لاین‌ها خواهد شد. در مطالعه‌ی Park و همکاران برای محاسبه‌ی متوسط پهنای لاین از روش تقاطع یک خط افقی و موازی با محور X سیگنال پروجکشن-پروفایل استفاده گردید (۱۱). خط افقی سبز رنگ (شکل ۲) چگونگی این کار را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل مشخص خواهد شد که با وجود اعمال خط افقی در مناسب‌ترین مختصات، پهنای واقعی برخی از لاین‌ها با خطای زیادی محاسبه می‌شود که دلیل آن، ارتفاع غیر یکسان قله‌ها و عدم تقاطع خط افقی با پهنای میانی قله‌ها می‌باشد. در الگوریتم پیشنهاد شده‌ی مطالعه‌ی حاضر، از تکنیک چگالی طیف توان استفاده شد. از آن جا که طیف توان به دست آمده در ناحیه‌ی فرکانسی متناظر

همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است، مقادیر پهنای متوسط لاین به دست آمده از روش تقاطع خط افقی با مقادیر واقعی آن اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0/001$)؛ در حالی که بین مقادیر در روش چگالی طیف توان با مقادیر واقعی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0/062$). همچنین، فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد روش تقاطع خط افقی، ۳/۱۶-۲/۵۴ و فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد روش چگالی طیف توان، ۰/۱۴-۰/۱۲ بود. با توجه به این که میانگین خطای به دست آمده از روش چگالی طیف توان و تقاطع خط افقی به ترتیب برابر با ۰/۰۱۱ و ۲/۸۵ بود، می‌توان گفت که روش پیشنهادی ما، ۹۹/۶ درصد خطای ناشی از روش تقاطع خط افقی با سیگنال پروجکشن-پروفایل را کاهش داد.

بحث

از آن جا که امروزه از کامپیوتر برای پردازش تصاویر PFGE به صورت گسترده استفاده می‌شود، اعمال فرایندهای پردازشی صحیح و دقیق در مراحل مختلف پردازش به منظور آنالیز تصاویر PFGE از اهمیت بالایی برخوردار است. اولین مرحله‌ی پردازش، آشکارسازی و استخراج لاین‌ها می‌باشد. دقت تمام مراحل بعدی پردازش، به انجام صحیح این مرحله وابسته است. تاکنون، مشهورترین روش برای آشکارسازی لاین‌ها، استفاده از پروجکشن-پروفایل روی محورهای X و Y بوده است (۹، ۷). با توجه به این که شرایط آزمایشگاهی مانند دما، pH محیط و حتی بار الکتریکی ذرات می‌توانند بر کیفیت تصاویر PFGE تأثیر بگذارند و باعث ایجاد انحنای آن شوند، در مطالعه‌ی حاضر الگوریتم‌هایی به منظور آشکارسازی و استخراج لاین‌های دارای انحنای

لاین ارایه می‌دهد. همچنین، مقادیر P نشان می‌دهد که این روش در مقایسه با روش تقاطع خط افقی جایگزین خوبی برای مقادیر واقعی پهنای لاین می‌باشد. از آنجا که آشکارسازی صحیح لاین برای انجام صحیح فرایند کلی پردازش تصاویر PFGE ضروری و دارای اهمیت فراوانی است، استفاده از الگوریتم پیشنهاد شده‌ی این مطالعه می‌تواند باعث بهبود فرایند استخراج لاین گردد. همچنین، با توجه به این که ماهیت پردازشی تصاویر ژل الکتروفورز یکسان می‌باشد، می‌توان از این الگوریتم برای پردازش انواع دیگر PFGE مانند ژل الکتروفورز میدان متعامد، ژل الکتروفورز میدان معکوس شونده، ژل الکتروفورز میدان متغیر عرضی و موارد دیگر استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به جهت حمایت مالی تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند. مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد بود که به صورت طرح تحقیقاتی با شماره‌ی ثبت ۹۳۲۴۶ در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تصویب گردید.

با پهنای متوسط لاین‌ها بعد از فرکانس مربوط به پس‌زمینه، دارای بیشترین چگالی است، آشکارسازی این فرکانس تخمین خوبی از پهنای متوسط لاین‌ها ارایه داد؛ به گونه‌ای که ۹۹/۶ درصد از خطای روش استفاده شده در تحقیق Park و همکاران (۱۱) را کاهش داد. همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، می‌توان گفت که علاوه بر وجود اختلاف معنی‌دار روش تقاطع خط افقی با مقادیر واقعی، روش طیف توان اختلاف معنی‌داری با مقادیر واقعی ندارد. بنابراین، می‌تواند جایگزین خوبی برای مقادیر واقعی باشد. از پارامتر پهنای متوسط لاین علاوه بر صاف سازی سیگنال، در حذف مراکز لاینی که به اشتباه آشکار شده بودند و همچنین، تشخیص مراکز لاین مربوط به یک لاین خاص نیز استفاده شد که به طور طبیعی در این مراحل نیز منجر به افزایش کارایی الگوریتم گردید.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر، می‌توان گفت که چگالی طیف توان سیگنال حاصل از پروچکشن-پروفایل تصاویر PFGE تخمین خوبی نسبت به سایر روش‌ها از پارامتر پهنای متوسط

References

- Birren B, Lai E. Pulsed field gel electrophoresis: A practical guide. San Diego, CA: Academic Press; 1993.
- Hoelzel AR, Dover GA. Molecular genetic ecology: In focus. Oxford, UK: Oxford University Press; 1992.
- Pizzonia J. Electrophoresis gel image processing and analysis using the KODAK 1D software. *Biotechniques* 2001; 30(6): 1316-20.
- Maramis C, Delopoulos A. Efficient quantitative information extraction from PCR-RFLP gel electrophoresis images. *Proceedings of 20th International Conference on Pattern Recognition (ICPR)*; 2010 Aug 23-26; Istanbul, Turkey.
- Blatter A, Reich E. Qualitative and quantitative HPTLC methods for quality control of *Stephania tetrandra*. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2005; 27(13): 2087-100.
- Schibli A, Reich E. Modern TLC: A key technique for identification and quality control of botanicals and dietary supplements. *JPC J Planar Chromatogr Mod TLC* 2005; 18(101): 34-8.
- Akbari A, Albrechtsen F, Jakobsen KS. Automatic lane detection and separation in one dimensional gel images using continuous wavelet transform. *Anal Methods* 2010; 2(9): 1360-71.
- Wong RTF, Flibotte S, Corbett R, Saeedi P, Jones SJM, Marra MA, et al. LaneRuler: automated lane tracking for DNA electrophoresis gel images. *Automation Science and Engineering, IEEE Transactions on* 2010; 7(3): 706-8.
- Sousa AV, Aguiar R, Mendonca A, Campilho A. Automatic lane and band detection in images of thin layer chromatography. In: Campilho A, Kamel M, editors. *Image analysis and recognition*. New York, NY: Springer; 2004. p. 158-65.
- Machado AMC, Campos MFM, Siqueira AM, de Carvalho OSF. An iterative algorithm for segmenting lanes in gel electrophoresis images. *Proceedings X Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing*; 1997 Oct 14-17; Campos do Jordao, Brazil. p. 140-6.
- Park SC, Na IS, Han TH, Kim SH, Lee GS. Lane detection and tracking in PCR gel electrophoresis images. *Comput Electron Agr* 2012; 83: 85-91.
- Dhanasekaran D, Bagan KB. High speed pipelined architecture for adaptive median filter. *European Journal of Scientific Research* 2009; 29(4): 454-60.
- Wheelock AM, Buckpitt AR. Software-induced variance in two-dimensional gel electrophoresis image analysis. *Electrophoresis* 2005; 26(23): 4508-20.
- Kaczmarek K, Walczak B, de Jong S, Vandeginste BG. Preprocessing of two-dimensional gel electrophoresis images. *Proteomics* 2004; 4(8): 2377-89.
- Otnes RK, Enochson L, Maqusi M. *Applied time series analysis*. vol. 1. New York, NY: Wiley; 1978. p. 449.
- Stoica P, Moses RL. *Introduction to spectral analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 1997.
- Chui CK. *An introduction to wavelets*. San Diego, CA: Academic Press; 1992.
- Chai T, Draxler R. Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)? Arguments against avoiding RMSE in the literature. *Geosci. Model Dev* 2014; 7: 1525-34.

A New Method for Calculating Lane Average Width on the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Images for Lane Detection and Extraction Problem

Mohammad Rezaei¹, Mahmood Amiri PhD², Parviz Mohajeri PhD³, Mansour Rezaei PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: We aimed to a new method to calculate the lane average width on the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) images for lane detection and extraction problem. Although some studies are reported for lane detection based on vertical projection profile, they are not automatic with low error. Average width of lane is the most important parameter that is required for automatic image processing of PFGE images. This research with the aim of using the power spectrum density to calculate the lane average width was carried out.

Methods: First, based on the power spectral density, PFGE images were processed. The proposed algorithm was trained using 10 PFGE images and then evaluated for 20 PFGE images which totally consisted of 300 lanes. These images were developed using Bio-Rad model of PFGE in Microbiology Laboratory of Kermanshah University of Medical Sciences, Iran.

Findings: The power spectrum density procedure in contrast to intersection of the horizontal lane yields decreased 99.61% of calculation error for lane detection.

Conclusion: Considering the lane average width is used in several stages for lane detection and extraction procedure, it can be concluded that the power spectrum density improves the process of lane extraction significantly.

Keywords: Power spectrum density, Average Lane width, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

Citation: Rezaei M, Amiri M, Mohajeri P, Rezaei M. A New Method for Calculating Lane Average Width on the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Images for Lane Detection and Extraction Problem. J Isfahan Med Sch 2015; 33(359): 1965-72

1- MSc Student, Department of Biomedical Engineering, School of Medicine AND Students Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2- Assistant Professor, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

4- Associate professor, Department of Biostatistics, Social Development and Health Promotion Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Corresponding Author: Mahmood Amiri PhD, Email: ma.amiri@ece.ut.ac.ir

بررسی تأثیر کاهش بعد بر فضای ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن ساخته شده از میکروآرایه به منظور پیش‌گویی عود سرطان سینه

دکتر علیرضا مهری دهنوی^۱، حامد زند^۲، دکتر محمدرضا صحتی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یکی از روش‌های متداول در طبقه‌بندی نمونه‌های سرطانی، استفاده از ویژگی‌های به دست آمده از داده‌ی بیان ژن در میکروآرایه‌های DNA می‌باشد. در این خصوص، با استفاده از ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن بازسازی شده از داده‌های بیان ژن، می‌توان با بهره‌گرفتن از اطلاعات تعامل بین ژن‌ها، به یافته‌های مطمئن‌تری دست یافت. هدف از انجام این مطالعه، پیش‌گویی عود سرطان سینه بر اساس انتخاب ویژگی مبتنی بر ویژگی‌های توپولوژیک، متناظر با شبکه‌ی ارتباطی ژن‌ها بود.

روش‌ها: هفت مجموعه داده‌ی بیان ژن میکروآرایه شامل ۱۲۷۱ نمونه مربوط به سرطان سینه در مطالعه‌ی حاضر مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا شبکه‌ی ارتباطی ژن‌ها از داده‌های آموزش با اعمال روش انتخاب ویژگی Fisher (Fisher discriminant analysis) بر داده‌های ویژگی توپولوژیک این شبکه، ساخته شد. به دلیل این که نمی‌توان برای یک نمونه شبکه‌ی ژن ساخت؛ این نمونه به کل داده‌های آموزشی اضافه و دوباره شبکه‌ی ژن ساخته شد. سپس، همبستگی بین بردارهای ویژگی توپولوژیک ژن‌های شاخص در دو شبکه، قبل و بعد از اضافه شدن نمونه‌ی آزمایش محاسبه گردید. در نهایت، نمونه‌ای با همبستگی بیشتر در یک کلاس نسبت به کلاس دیگر، جزء همان کلاس در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: صحت پیش‌گویی به دست آمده بر اساس ویژگی‌های توپولوژیک مربوط به شبکه‌ی بازسازی شده از داده‌های بیان ژن نسبت به انتخاب ویژگی مستقیم از این داده‌ها بالاتر بود. بیشترین صحت طبقه‌بندی بر اساس ویژگی توپولوژیک توزیع درجه‌ی تمرکز (متوسط ۹۸/۵ درصد در داده‌ی آزمایش) به دست آمد.

نتیجه‌گیری: استفاده از ساختار توپولوژی شبکه‌ی ژنی، ویژگی‌های پایدارتری را نسبت به کاربرد مستقل مقدار بیان ژن به منظور پیش‌گویی و طبقه‌بندی سرطان فراهم می‌آورد.

واژگان کلیدی: سرطان سینه، بیان ژن، شبکه‌ی ژن، توپولوژی

ارجاع: مهری دهنوی علیرضا، زند حامد، صحتی محمدرضا. بررسی تأثیر کاهش بعد بر فضای ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن ساخته شده از میکروآرایه به منظور پیش‌گویی عود سرطان سینه. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۸۵-۱۹۷۴

مقدمه

سرطان سینه یکی از سرطان‌های شایع در میان جمعیت زنان جهان می‌باشد. بر اساس آخرین آمار مرکز تحقیقات سرطان ایران، سالانه حدود ۸۵۰۰ مورد جدید سرطان پستان در کشور ثبت می‌شود و ۱۴۰۰ نفر به دلیل ابتلا به سرطان پستان فوت می‌کنند. همچنین، در حال حاضر حدود ۴۰۰۰۰ بیمار مبتلا به این بیماری در کشور زندگی می‌کنند. در بین انواع مختلف سرطان، سرطان سینه ۲۳ درصد همه‌ی سرطان‌ها در زنان را شامل می‌شود (۱). بنابراین، تشخیص به‌هنگام و

دقیق‌تر مراحل و میزان پیشرفت این سرطان امری مهم و حیاتی محسوب می‌گردد. در بیشتر موارد، این تشخیص در محیط آزمایشگاه و طبق نظر پاتولوژیست صورت می‌گیرد. در مرحله‌ی بعد، در صورت پی بردن به سرطانی بودن بافت، مرحله‌ی پیشرفت آن تعیین و در نهایت بازگشت‌پذیر بودن (۲-۳) یا عود سرطان در آینده مشخص خواهد شد، اما به منظور افزایش صحت تصمیم‌گیری، بحث شکل‌گیری و توسعه‌ی سرطان باید در سطح ژنوم انسان مورد بررسی قرار گیرد (۴). به همین منظور، می‌توان از فن‌آوری میکروآرایه برای

۱- دانشیار، گروه بیوالکتریک، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۳- استادیار، گروه بیوالکتریک، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤو: دکتر محمدرضا صحتی

Email: mr.sehhati@gmail.com

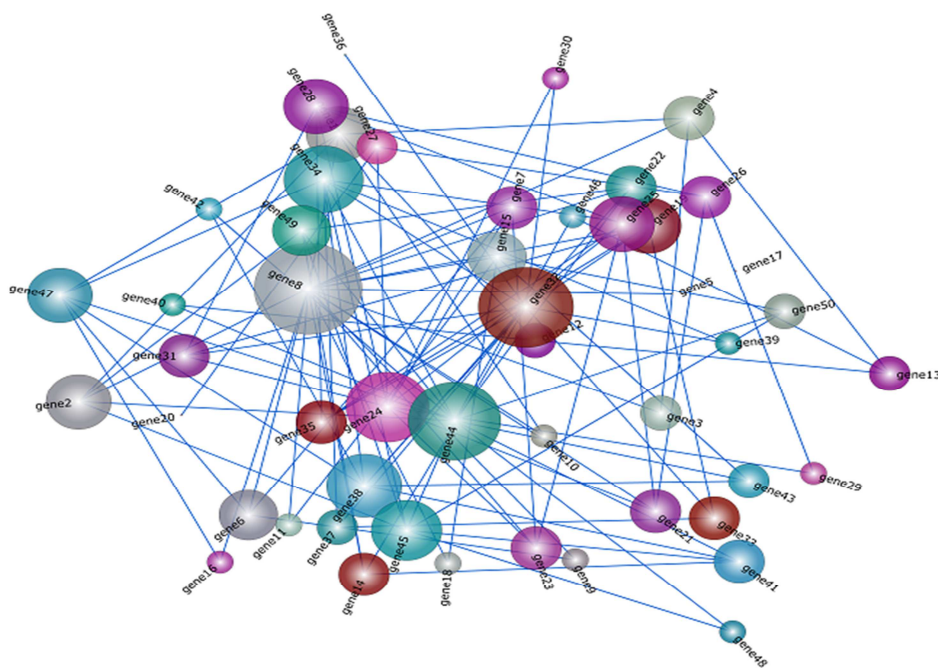
نمود تا از این طریق درک بهتری از وضعیت نمونه‌های مورد بررسی حاصل شود. جهت استنتاج شبکه‌ی ژن از روی داده‌های بیان ژن، روش‌های مختلفی وجود دارد که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به مدل‌های ارتباطی (Relevance network) (۹)، مدل‌های منطقی (Logic models) (۱۰)، مدل‌های Bayesian (Bayesian models) (۱۱)، معادلات تفاضل (Differential equations) (۱۲)، مدل فضای حالت (State space model) (۱۳)، مدل‌های مبتنی بر شبکه‌ی عصبی (Neural network) (۱۴) و مدل‌های پیمانه (Modular models) (۱۵) اشاره نمود.

به منظور ساخت شبکه در مطالعه‌ی حاضر و به دلیل ساده بودن و حجم پایین محاسبات و همچنین، تناسب بیشتر مجموعه‌ی داده‌ها برای مدل‌سازی شبکه‌ی ارتباطی، مدل نوع ارتباطی نسبت به مدل‌های دیگر جهت ساخت شبکه‌ی ژن ارجحیت داده شد. در عمل از یک نمونه نمی‌توان یک شبکه‌ی ژن ساخت؛ چرا که به مجموعه‌ای از نمونه‌ها نیاز است تا استنتاج شبکه‌ی ژن محقق شود. از طرف دیگر، نمی‌توان در مورد نمونه‌ای که از آن در ساخت شبکه استفاده نشده است، بر اساس نمونه‌های استفاده شده تصمیم‌گیری نمود. در مطالعه‌ی Liu و همکاران طبقه‌بندی هر نمونه‌ی سرطان بر اساس ساخت شبکه‌ی ژن از کل داده‌ها و اضافه شدن نمونه‌ی آزمایش به هر گروه داده‌ها بر اساس محاسبه‌ی ضریب همبستگی Pearson بین شبکه‌ها انجام شد (۱۶).

بررسی بیان ژن‌ها در بافت تومور استفاده نمود (۵).

با استفاده از فن‌آوری میکروآرایه، مجموعه ژن‌هایی از بافت مشخصی مانند بافت سینه به طور هم‌زمان از نظر سطح بیان ژن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند (۶)، اما مقدار بیان اندازه‌گیری شده برای هر ژن توسط میکروآرایه، اطلاعاتی از نحوه‌ی تعامل آن ژن با سایر ژن‌ها ارائه نخواهد داد. برای رفع این کمبود، باید از مدل‌های تعاملی یا شبکه‌های بیولوژیک استفاده کرد که در آن‌ها تعامل بین ژن‌ها و پروتئین‌ها نیز در نظر گرفته می‌شود. مدل ریاضی این شبکه‌ی تعاملی را می‌توان به صورت یک گراف در نظر گرفت که گره‌های آن همان ژن‌ها هستند و یال‌های این گراف، وجود میان‌کنش بین دو ژن (گره) را نمایش می‌دهند. شبکه‌های بیولوژیک استاندارد تحت شرایط آزمایشی خاصی ساخته می‌شوند و با وجود این‌که داده‌های ارزشمند و مفیدی در اختیار ما قرار می‌دهند، اما در مجموع داده‌های کاملی نیستند و عاری از خطا نمی‌باشند (۷). در این باره یکی از استراتژی‌هایی که محققان در حال حاضر دنبال می‌کنند، ساخت شبکه‌های ژنی است که تعاملات بین ژن‌ها را بر اساس تغییرات سطح بیان آن‌ها مورد بررسی قرار می‌دهد. نمونه‌ی ساده از شبکه‌ی تعامل ژن با ژن در شکل ۱ نشان داده شده است (۸).

با ساخت شبکه‌ی ژن از روی مجموعه داده‌های بیان ژن در سطح میکروآرایه، می‌توان علاوه بر اطلاعات مستقل ژن‌ها، اطلاعاتی در مورد تعاملات و تأثیرگذاری ژن‌های مختلف نسبت به یکدیگر کسب



شکل ۱. شبکه‌ی تعامل ژن با ژن

روش‌ها

تهیه‌ی داده‌ها: مجموعه داده‌ی مورد استفاده، مربوط به هفت مطالعه‌ی مستقل در زمینه‌ی سرطان سینه و شامل ۱۲۷۱ نمونه بود که از سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center of Biotechnology Information) دانلود شد. قبل از ساخت شبکه‌ی ژن و به منظور نرمال کردن داده‌ها، ابتدا تابع لگاریتم بر داده‌های میکروآرایه اعمال شد و سپس، مقادیر بیان ژن در راستای ستون‌ها و سطرها ماتریس به طور متوالی نرمال گردید. داده‌ها شامل دو گروه سرطانی کم‌خطر (نمونه‌هایی که تا پنج سال از زمان تشخیص در آن‌ها متاستاز رخ نداده است) و پرخطر (نمونه‌هایی که در فاصله‌ی کمتر از پنج سال از زمان تشخیص در آن‌ها متاستاز رخ داده است) بود و در مجموع، ۸۹۲ نمونه‌ی کم‌خطر و ۳۷۹ نمونه‌ی پرخطر بررسی گردید. از گروه پرخطر ۸۰ نمونه به طور تصادفی به عنوان نمونه‌ی آزمایش و ۲۹۹ نمونه‌ی باقی‌مانده به عنوان داده‌ی آموزشی و در گروه کم‌خطر نیز ۱۸۰ نمونه برای آزمایش و ۷۱۲ نمونه برای آموزش در نظر گرفته شد. ساخت شبکه‌ی ژن از روی داده‌های آموزشی برای هر دو گروه داده‌ها به طور مستقل انجام گرفت.

انتخاب ژن مبتنی بر داده‌ی ویژگی توپولوژیک: در تمامی مراحل بررسی از جمله در مرحله‌ی ساخت شبکه‌ی ژن، از روش انتخاب ویژگی مبتنی بر فیلتر Fisher (Fisher discriminant analysis) (۲۳) استفاده گردید که تابع امتیازدهی S در آن به صورت رابطه‌ی ۱ است.

$$S_{12}(f) = \frac{|m_1 - m_2|}{(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad \text{رابطه‌ی ۱}$$

عنصر m بیانگر میانگین بیان ژن‌ها در نمونه‌های هر گروه و σ بیانگر انحراف استاندارد آن‌ها در همان گروه می‌باشد. در مرحله‌ی اول، ابتدا انتخاب ویژگی از داده‌های میکروآرایه انجام گردید و بر اساس ژن‌های انتخاب شده (۵۰ تا ۲۰۰ ژن دارای بالاترین رتبه)، شبکه‌ی ژن ساخته شد. بعد از ساخت شبکه‌ی ژن، ویژگی‌های توپولوژیک آن استخراج شد (جدول ۱) و ماتریس‌هایی که حاوی مقادیر کمی از هر ویژگی توپولوژیک هستند، به دست آمد.

در مرحله‌ی دوم، شبکه‌ی ژن از ماتریس داده‌ی ویژگی توپولوژیک با بیشترین تعداد ژن بازسازی شد که به دنبال آن ماتریس‌های ویژگی توپولوژیک بعد از انتخاب ویژگی از ماتریس داده‌ی ویژگی توپولوژیک با بیشترین تعداد ژن ایجاد گردید. در مطالعه‌ی حاضر به دلیل این‌که بیشترین تعداد ژن برای ماتریس داده‌ی توپولوژیک استخراج شد، بعد از ساخت شبکه‌ی ژن از داده‌های میکروآرایه، ماتریس حاوی ۲۰۰ ژن بود. بنابراین، در مرحله‌ی دوم

در مطالعه‌ی دیگری از Liu و همکاران، آنالیز مسیرهای بیولوژیک (Pathway analysis) با ساخت شبکه‌ی ژن مبتنی بر ضریب رتبه‌بندی ژن‌ها به جای شبکه‌های مبتنی بر همبستگی بین ژن‌ها صورت گرفت (۱۷).

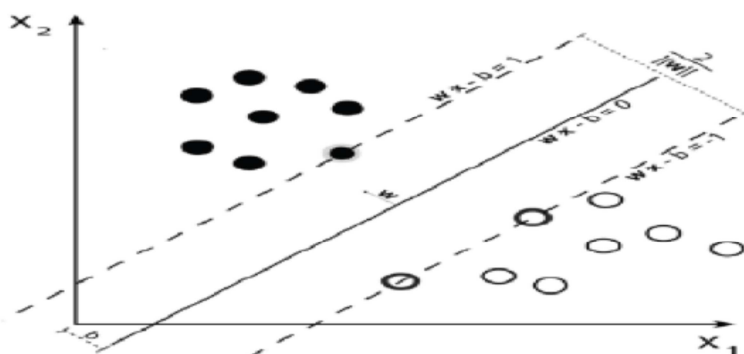
Jaiswal و Raza با ساخت شبکه‌های تنظیم ژن از داده‌های بیان ژن، روابط تنظیم‌کننده ژن‌ها در شبکه‌های تنظیم ژن را بررسی کردند که برخی از ژن‌های شبکه‌ی تنظیم از نظر بیان بیشتر در تمامی نمونه‌ها به عنوان هدف‌های دارویی جهت تشخیص سرطان در نظر گرفته شدند (۱۸). تحقیق Yang و همکاران چارچوب استنتاج مبتنی بر شبکه‌ی تفاضلی را [که یک روش آنالیز آماری مبتنی بر شبکه (Network-based statistical analysis method) است] به دو مجموعه داده‌ی مستقل سرطان سینه اعمال کردند که با تفاضل دو شبکه‌ی ژن از دو مجموعه داده‌ی سرطان، مدل شبکه‌ی تفاضلی به دست آمد. در نهایت از شبکه‌ی تفاضلی در رتبه‌بندی ژن‌ها برای شناسایی بیومارکرها استفاده شد (۱۹).

پژوهش Chuang و همکاران، روشی مبتنی بر شبکه‌های پروتئینی ارائه نمود که از نشانگرهایی به عنوان زیرشبکه‌های استخراج شده از داده‌های تعامل پروتئینی در طبقه‌بندی سرطان استفاده کرده بود (۲۰). Ahn و همکاران با استفاده از داده‌های نرمالیزه شده‌ی سرطان پروستات، شبکه‌های ژنی برای کلاس نرمال و سرطانی را بازسازی کردند. آن‌ها در مطالعه‌ی خود از شبکه‌های ژن استاندارد و آنالیز مسیر بیولوژیک استفاده نمودند (۲۱). در مطالعه‌ی Bockmayr و همکاران، الگوریتم‌های DCglob و DCloc توسعه یافت و با مقایسه‌ی تغییرات توپولوژیک از شبکه‌های ژن ساخته شده از دو بیماری مختلف، الگوهای همبستگی تفاضلی بین شبکه‌های ساخته شده از دو بیماری شناسایی شد (۲۲).

هدف اصلی از انجام مطالعه‌ی حاضر، کاهش بعد یا حذف ژن‌های غیر مفید در طبقه‌بندی سرطان سینه بر اساس ساخت شبکه‌ی ژن و استفاده از انتخاب ویژگی از روی داده‌های ویژگی توپولوژیک شبکه‌ی ژن بود. در بیشتر مطالعات قبلی، انتخاب ژن به طور مستقیم از روی داده‌ی بیان ژن انجام شده بود؛ به طوری که ساخت شبکه‌ی ژن از روی داده‌ی بیان ژن صورت می‌گرفت، اما در تحقیق حاضر برای ساخت شبکه‌ی ژن از داده‌های ویژگی توپولوژیک استفاده گردید. لازمه‌ی ساخت شبکه‌ی ژن از داده‌ی توپولوژیک، استخراج داده‌های ویژگی توپولوژیک بعد از ساخت شبکه‌ی ژن از داده‌های بیان ژن در میکروآرایه می‌باشد. انتخاب بهترین ویژگی توپولوژی شبکه در جهت دستیابی به بالاترین صحت پیش‌گویی عود سرطان سینه و نیز شناسایی ژن‌های شاخص مرتبط با عود سرطان، در مطالعه‌ی حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. ویژگی‌های توپولوژیک متداول در توصیف گراف‌ها (۲۴-۲۵)

ویژگی	تعریف
درجه‌ی تمرکز	معرف تعداد اتصالات یک گره از نظر مرکزیت بودن گره نسبت به گره‌های متصل به آن است.
توزیع درجه	تعداد اتصالات یک گره در شبکه‌ی ژن با نرمالیزه کردن اتصالات مربوط به مرکزیت یا تمرکز ژن از نظر اهمیت اتصال
بینایی بودن	معیاری است که نشان می‌دهد چه تعداد مسیر کوتاه از طریق یک گره عبور می‌کند و تعیین می‌نماید که کدام گره اثر واسطه‌ای بیشتری روی گره‌های دیگر دارد.
نزدیکی گره	عکس دوری تعریف می‌شود که به مجموع فواصل تمام گره‌های دیگر به یک ژن را بیان می‌کند.
ضریب خوشه‌بندی	معیاری است برای بیان درجه‌ای که با آن گره‌ها در یک گراف تمایل دارند در یک خوشه کنار هم باشند.
ویژه بودن گره	بردار ویژه‌ی ژن‌ها معیاری از تأثیر و نقش یک گره در یک شبکه‌ی ژن است.



شکل ۲. قانون عملکرد SVM (Support vector machines) (۲۶)

۲۰ فایل ۱۰۰ نمونه‌ای هستند. در پژوهش حاضر به دلیل این‌که شبکه‌ی ژن برای دو گروه سرطان به طور جداگانه ساخته شد، برای هر دو گروه کم‌خطر و پرخطر، ۲۰ بردار ویژگی توپولوژیک وجود داشت که ستون‌های ماتریس بردارهای ویژگی توپولوژیک از هر ۲۰ فایل ۱۰۰ نمونه‌ای تشکیل شده بود. در صورتی که ستون‌های ماتریس در ماتریس داده‌ی بیان ژن را نمونه‌های سرطانی تشکیل می‌دهند، اما در ماتریس داده‌ی توپولوژیک، هر ستون ماتریس در واقع یک شبکه‌ی ژن ساخته شده از یک مجموعه‌ی ۱۰۰ نمونه‌ای می‌باشد؛ چرا که از یک نمونه نمی‌توان در ساخت شبکه‌ی ژن استفاده نمود، بلکه به مجموعه‌ای از نمونه‌ها نیاز است. به عبارت دیگر، یک ویژگی توپولوژیک در شبکه‌ی ژن، برای یک نمونه تعریف نمی‌شود، بلکه به مجموعه‌ای از نمونه‌ها نسبت داده می‌شود.

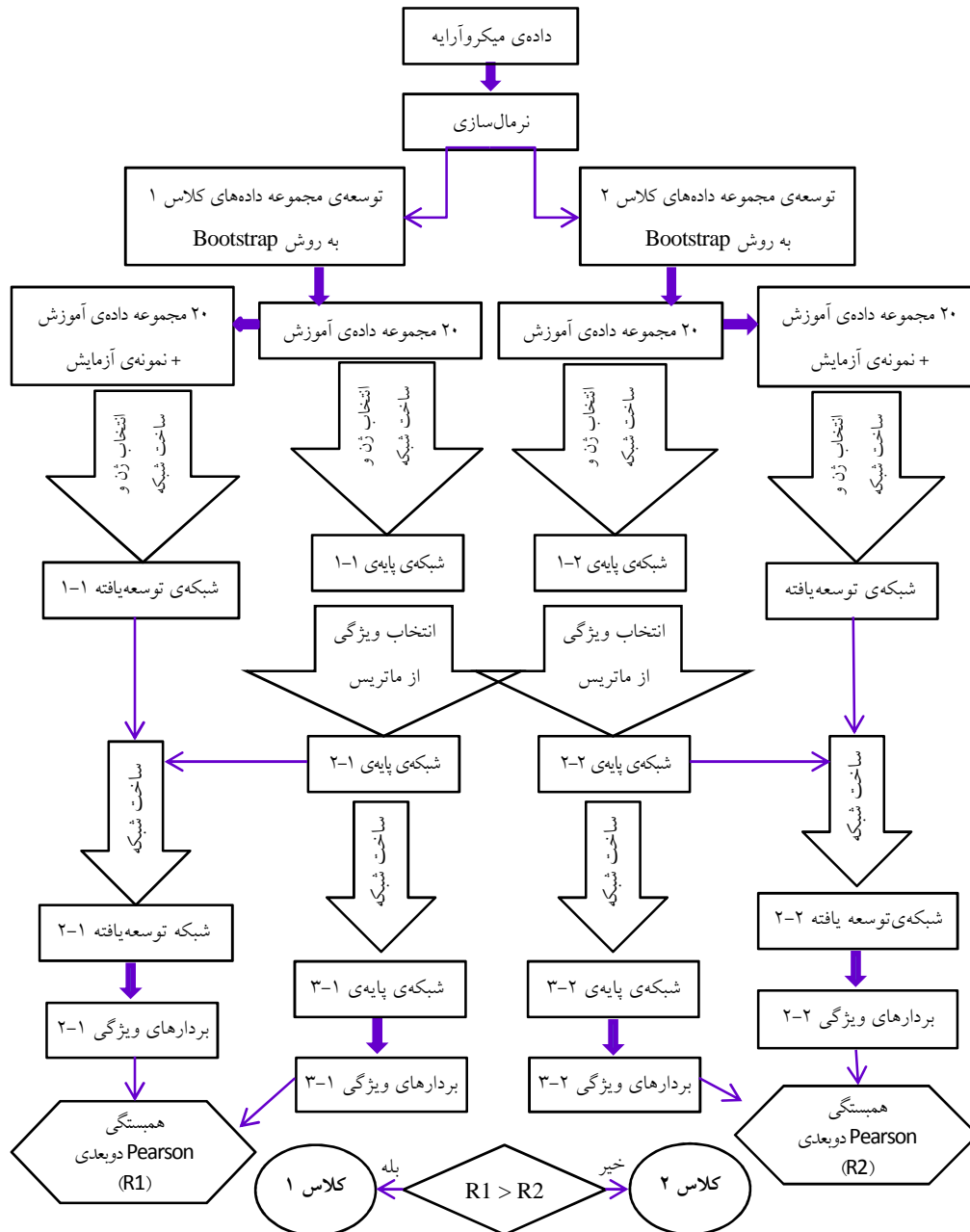
طبقه‌بندی نمونه‌ها: در مطالعه‌ی حاضر به منظور تفکیک دو گروه کم‌خطر و پرخطر در بین نمونه‌ها، از ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی به جای مقدار بیان ژن استفاده گردید. این امر با توجه به توضیحات بخش قبل نیازمند رویکرد خاصی برای طبقه‌بندی می‌باشد که در شکل ۲ آمده است. مطابق شکل ۳، برای طبقه‌بندی نمونه‌های آزمایش، ابتدا داده‌های بیان ژن از یک نمونه‌ی آزمایش به کل داده‌های آموزش در هر دو گروه اضافه و شبکه‌های ژن متناظر بازسازی شد. شبکه‌ی ژن بازسازی شده

انتخاب ویژگی از روی ماتریس، داده‌ی توپولوژی با ۲۰۰ ژن انجام گرفت. بر خلاف مرحله‌ی قبل که به طور مستقیم انتخاب ویژگی روی داده‌ی بیان ژن اعمال شد، در این مرحله انتخاب ژن‌های شاخص بر اساس ویژگی‌های توپولوژیک انجام گرفت. با اعمال الگوریتم انتخاب ویژگی بر روی داده‌های ویژگی توپولوژیک، ژن‌های مورد نظر برای ساخت شبکه‌ی ژن تعیین شدند. بنابراین، شبکه‌ی ژن جدید بر اساس ژن‌های انتخاب شده از داده‌های ویژگی توپولوژیک ساخته شد.

با توجه به این‌که ژن‌های شاخص انتخاب شده در مرحله‌ی دوم از شبکه شامل ۲۰۰ ژن بود، نمی‌توان برای مرحله‌ی آزمایش فقط از این ژن‌ها برای ساخت شبکه استفاده کرد. بنابراین، اگر به گونه‌ای از ژن‌های متصل به ژن‌های شاخص انتخاب شده به طور اولیه در طبقه‌بندی استفاده شود، به نظر می‌رسد قدرت طبقه‌بندی کننده در طبقه‌بندی نمونه‌های سرطانی بهبود یابد. برای دستیابی به این هدف کافی است که تمام ژن‌های متصل به ژن‌های اولیه‌ی انتخاب شده، برای ساخت شبکه‌ی جدید به کار گرفته شوند. معیار اتصال ژن‌ها در این مورد، وجود همستگی بیش از یک آستانه‌ی مشخص بین پروفایل داده‌ی ویژگی توپولوژیک می‌باشد. لازم به ذکر است که ماتریس‌های ویژگی توپولوژیک شامل داده‌های توپولوژیک از

همچنین، از داده‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن پایه هم دوباره شبکه‌ی ژن جدیدی بازسازی گردید. در مرحله‌ی بعد، ضرایب همبستگی دو بعدی بین بردارهای ویژگی توپولوژیک شبکه‌های ژن پایه (ساخته شده از شبکه‌ی ژن پایه) و بازسازی شده (شبکه‌ی بازسازی شده بعد از اضافه شدن داده‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن ساخته شده از نمونه‌ی آزمایش به داده‌های ویژگی توپولوژیک شبکه‌ی پایه) محاسبه شد.

مشکل از داده‌های یک نمونه‌ی آزمایش و سایر داده‌های آموزشی مربوط به یکی از دو گروه نمونه می‌باشد. پس از ساخت شبکه از داده‌های آموزش (شبکه‌ی پایه) و شبکه‌ی ژن بازسازی شده و بعد از اضافه شدن نمونه‌ی آزمایش به داده‌ی آموزش (شبکه‌ی توسعه یافته)، داده‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن ساخته شده از نمونه‌ی آزمایش به داده‌های ویژگی توپولوژیک اضافه گردید و شبکه‌ی ژن توسعه یافته‌ی جدیدی بازسازی شد.



شکل ۳. چارچوب کار طبقه‌بندی نمونه‌های آزمایش بر اساس ساخت شبکه‌ی ژن و ضریب همبستگی بین شبکه‌ها

رابطه‌ی ۴ یک ابرصفحه را تعریف می‌کند:

$$\text{رابطه‌ی ۴} \quad \langle w, x \rangle + b = 0$$

نقطه روی مرز تصمیم‌گیری (ابرفصفحه) و w یک بردار عمود بر مرز تصمیم‌گیری و b مقدار Bias و مقداری حقیقی است. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، $b/\|w\|$ بیانگر فاصله‌ی مبدأ تا مرز تصمیم‌گیری و $\langle w, x \rangle$ بیانگر ضرب داخلی دو بردار x و w می‌باشد. از آنجا که با ضرب یک ضریب ثابت در هر دو طرف معادله‌ی فوق باز هم تساوی برقرار است، بنابراین برای تعریف یکتای مقدار b و w شرایط زیر بر روی آن‌ها اعمال می‌شود:

$$\text{رابطه‌ی ۵} \quad \text{اگر } x_i \text{ یک بردار پشتیبان باشد.} \quad y(x_i^T w + b) = 1$$

$$\text{اگر } x_i \text{ یک بردار پشتیبان نباشد.} \quad y(x_i^T w + b) = -1$$

برای افزایش حاشیه، باید مقدار w کمینه شود. طبق شرایط فوق می‌توان رابطه‌ی ۶ را نتیجه گرفت.

$$\text{رابطه‌ی ۶} \quad w^T x_i + b > 1$$

برای راحتی کار و استفاده از جبر خطی، به جای کمینه کردن w تابع $1/2\|w\|^2$ کمینه می‌گردد. با یادآوری توابع لاگرانژ و شروط Karush-Kuhn-Tucker، اگر بخواهد تابعی مثل $F(x)$ نسبت به متغیر مستقل خود یعنی x کمینه شود به شرطی که $g(x) \geq 0$ باشد، می‌توان از تابع لاگرانژ (رابطه‌ی ۷) استفاده نمود.

$$\text{رابطه‌ی ۷} \quad U \geq 0; L(x, u) = F(x) - UG(x)$$

که در این تابع باید x کمینه و U بیشینه شود. بنابراین، شروط Karush-Kuhn-Tucker به صورت روابط ۸ و ۹ خواهد بود.

$$\text{رابطه‌ی ۸} \quad \frac{\partial L(x, u)}{\partial(x)} = 0$$

$$\text{رابطه‌ی ۹} \quad UG(x) = 0$$

حال اگر تابع $1/2\|w\|^2$ را به جای $F(x)$ فرض کنیم و این تابع را در روابط فوق (۶ و ۷) جایگذاری کنیم، روابط ۱۰ تا ۱۶ را داریم.

$$\text{رابطه‌ی ۱۰} \quad w = \sum_{i=1}^m a_i y_i x_i$$

$$\text{رابطه‌ی ۱۱} \quad \sum_{i=1}^m a_i y_i = 0$$

$$\text{رابطه‌ی ۱۲} \quad Q(w, b, a) = \sum_{i=1}^m a_i [y_i (w x_i - b) - 1] = \frac{1}{2} \|w\|^2$$

$$\text{رابطه‌ی ۱۳} \quad Q(a) = 1/2 \sum_i \sum_j a_i a_j y_i y_j x_i^T x_j + \sum_i a_i$$

$$\text{رابطه‌ی ۱۴} \quad \text{Minimize } 1/2 \sum_i \sum_j a_i a_j y_i y_j x_i^T x_j - \sum_i a_i$$

$$\text{رابطه‌ی ۱۵} \quad H = y_i y_j x_i x_j^T$$

اگر جدایی‌پذیری به صورت خطی نباشد، نمونه‌ها به یک فضا با بعد بالا نگاهت داده می‌شود که در فضای جدید نمونه‌ها می‌توانند

برای هر نمونه‌ی آزمایشی اضافه شده، ضریب همبستگی بین دو شبکه‌ی ژن حاصل از افزودن نمونه به یکی از گروه‌ها محاسبه شد. سپس بر اساس ضرایب همبستگی به دست آمده برای تمام نمونه‌های آزمایش بین دو گروه، در مورد برجسب نمونه تصمیم‌گیری گردید. در این خصوص نمونه‌ای که ضریب همبستگی محاسبه شده‌ی بین شبکه‌های آن در نتیجه‌ی اضافه شدن به مجموعه‌ی داده‌های آموزشی یک گروه سرطان بیشتر از گروه دیگر بود، جزء همان گروه در نظر گرفته می‌شد. در مطالعه‌ی حاضر برای سنجش یافته‌های حاصل از روش پیشنهادی، از طبقه‌بندی کننده‌های غیر خطی k -NN (Support vector machines) SVMs و $(k\text{-nearest neighbor})$ (۲۷) استفاده شد که در ادامه به معرفی مختصر این دو طبقه‌بندی کننده پرداخته شد.

طبقه‌بندی کننده‌ی k -NN یکی از بهترین طبقه‌بندی‌ها، طبقه‌بندی کننده‌ی k -NN است (۲۶). این طبقه‌بندی نمونه‌ی تست را متعلق به کلاسی می‌داند که بیشترین آرا را در بین k نزدیک‌ترین همسایگان آن داشته باشد. برای به دست آوردن نزدیک‌ترین همسایگان یک نمونه، اغلب از فاصله‌ی اقلیدسی طبقه‌بندی استفاده می‌شود.

$$\text{رابطه‌ی ۲} \quad \text{deucl}(x, t) = \sqrt{\sum_{i=1}^m d_{\text{eucl}}^i(x, t)}$$

اگر مقادیر خصوصیات عددی و پیوسته باشد، Deuclid از رابطه‌ی ۳ به دست می‌آید.

$$\text{رابطه‌ی ۳} \quad \text{deucl}(x, t) = (a_i(x) - a_i(t))^2$$

طبقه‌بندی کننده‌ی k -NN به دلیل قابلیت درک بالا و عدم نیاز به ایجاد فرضیه روی داده‌ها، روش ساده و پرکاربرد محسوب می‌شود. در این مطالعه طبقه‌بندی با تعداد همسایگی ۳ در داده‌ی بیان ژن و همسایگی ۱ در داده‌ی توپولوژی انجام گرفت. تعداد همسایگی ۱ برای داده‌ی توپولوژی به دلیل محدودیت تعداد ستون‌های داده‌ی توپولوژی بود.

طبقه‌بندی کننده‌ی SVMs (۲۹): طبقه‌بندی با SVM می‌تواند در مواقعی که داده‌ها به دقت به صورت دو کلاسی هستند، استفاده شود. SVM داده‌ها را با یافتن مهم‌ترین ابرصفحه که تمام نقاط داده از یک کلاس را از کلاس دیگر جدا می‌کند، طبقه‌بندی می‌نماید. مهم‌ترین ابرصفحه برای SVM به مفهوم بزرگ‌ترین حاشیه بین دو کلاس داده می‌باشد. حاشیه به مفهوم فاصله یا عرض بین دو خط موازی با ابرصفحه‌ای است که هیچ نقطه‌ای روی آن قرار ندارد (شکل ۲). بردارهای پشتیبان به نقاطی گفته می‌شود که به ابرصفحه یا خط جداساز نزدیک هستند. این نقاط روی مرز خط جداساز قرار دارند.

همبستگی Pearson به عنوان آستانه‌ی تعیین یال بین گره‌ها استفاده گردید (۰/۸۰). با توجه به امتیاز اختصاص یافته به ژن‌ها در رتبه‌بندی انجام شده بر اساس ویژگی‌های توپولوژیک مختلف و به منظور انتخاب ژن‌های شاخص، ویژگی توپولوژیک بینابینی مورد استفاده قرار گرفت. از آن جایی که در این روش امتیازدهی توزیع درجه بعد از ویژگی بینابینی در رتبه‌ی دوم قرار داشت، در ادامه‌ی ساخت شبکه‌ی ژن بر اساس داده‌های ویژگی توپولوژیک، توزیع درجه نیز انجام شد. برای این کار، بر اساس رتبه‌بندی انجام گرفته مبتنی بر ویژگی توزیع درجه، ۲۰ ژن با بالاترین رتبه برای ساخت شبکه‌ی ژن انتخاب شد. جهت توسعه‌ی مجموعه ژن‌های اولیه، ژن‌هایی که با همبستگی Pearson بالای ۰/۳۵ به ۲۰ ژن اولیه متصل بودند، به مجموعه اولیه اضافه شدند. بنابراین، ساخت شبکه‌ی ژن با انتخاب ژن‌های متصل به ۲۰ ژن انتخاب شده از ماتریس ویژگی توپولوژیک، توزیع درجه ادامه یافت.

در مرحله‌ی اول ارزیابی نتایج، مشابه با روش Liu و همکاران (۱۶-۱۷)، ابتدا تعداد ژن‌های مستخرج از میکروآرایه توسط یک روش انتخاب ویژگی کاهش یافت. پس از ساخت شبکه با ژن‌های منتخب، از طریق آستانه‌گذاری بر ضریب همبستگی بین مقدار ویژگی توپولوژیک در شبکه‌های متناظر با دو گروه نمونه‌ها طبقه‌بندی انجام گرفت. در این مرحله صحت طبقه‌بندی نمونه‌ها بر اساس ارزیابی مقاطع 5-fold محاسبه گردید و میانگین و انحراف معیار آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. ساخت شبکه با تعداد مختلف ژن (سطرهای جدول) انجام گرفت و در مرحله‌ی طبقه‌بندی از ویژگی‌های مختلف توپولوژی (ستون‌های جدول) به طور مستقل استفاده شد.

به صورت خطی از هم جدا شوند. طبق رابطه‌ی ۱۵، برای نگاشت به یک تابع هسته یا Kernel نیاز است. در نهایت، تابع نگاشت یا تبدیل فضای محدود به فضای دارای ابعاد بالا به صورت رابطه‌ی ۱۶ تعریف می‌شود.

$$G(x) = w^T \varphi(x) + b \quad \text{رابطه‌ی ۱۶}$$

در مطالعه‌ی حاضر پارامتر خروجی آلفا همان ضریب لاگرانژ بود که در روابط نوشته شده است و مقدار Bias (b)، ۱/۸۳۳- بود.

برای ارزیابی صحت طبقه‌بندی در تعداد ژن‌های مختلف انتخاب شده، از روش رویی‌سنجی مقاطع 5-fold استفاده شد (۲۹)؛ بدین صورت که نمونه‌های سرطانی مورد مطالعه از هر دو گروه سرطانی کم‌خطر و پرخطر به پنج قسمت مساوی تقسیم شدند و در هر بار ارزیابی برای محاسبه‌ی صحت طبقه‌بندی، یک قسمت از داده‌های هر گروه به عنوان داده‌ی آزمایش و چهار قسمت باقی‌مانده به عنوان داده‌ی آموزش در نظر گرفته شد. با تکرار ۵ بار این فرایند و چرخش نمونه‌های آزمایش در هر تکرار، تمام نمونه‌ها یک بار به عنوان داده‌ی آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از محاسبه‌ی صحت طبقه‌بندی برای هر بخش از داده‌ها در ۵ بار تکرار طبقه‌بندی، مقدار میانگین صحت‌های محاسبه شده برای ۵ بار محاسبه شد و به همراه مقدار انحراف استاندارد صحت نهایی ارائه گردید.

یافته‌ها

برای ساخت شبکه‌ی ژن به شیوه‌ی مدل ارتباطی از جعبه‌ی ابزار فوگا (۳۰) در نرم‌افزار MATLAB استفاده شد. بدین منظور از ضریب

جدول ۲. صحت طبقه‌بندی بر اساس ویژگی‌های توپولوژیک شبکه در تعداد ژن‌های مختلف با انتخاب ویژگی از داده‌ی بیان ژن

تعداد	توزیع درجه	درجه‌ی تمرکز	بینابینی	ضریب خوشه‌بندی	نزدیکی رؤس	گره‌ی ویژه
۶۰	۶۳/۵ ± ۷	۶۵/۰ ± ۱۰	۷۳/۵ ± ۲	۸۲/۰ ± ۶	۴۸/۰ ± ۵	۷۴/۵ ± ۱۵
۷۰	۵۷/۰ ± ۵	۵۹/۰ ± ۱۶	۶۹/۰ ± ۱۰	۷۶/۰ ± ۱۲	۴۴/۰ ± ۴	۶۶/۰ ± ۸
۸۰	۷۳/۵ ± ۶	۸۱/۰ ± ۶	۵۹/۰ ± ۶	۴۱/۰ ± ۱۳	۸۶/۰ ± ۱۳	۸۸/۵ ± ۴
۹۰	۶۳/۵ ± ۱۵	۷۰/۰ ± ۱۵	۵۳/۰ ± ۱۱	۳۸/۰ ± ۲۰	۷۸/۵ ± ۱۰	۷۶/۰ ± ۱۰
۱۰۰	۵۹/۰ ± ۱۳	۷۴/۰ ± ۱۱	۵۸/۵ ± ۱۲	۵۷/۵ ± ۱۶	۶۹/۵ ± ۸	۶۴/۰ ± ۱۷
۱۲۰	۵۹/۴ ± ۹	۷۱/۰ ± ۷	۸۴/۰ ± ۵	۶۸/۰ ± ۲۱	۷۹/۰ ± ۹	۶۷/۰ ± ۹
۱۴۰	۶۴/۹ ± ۵	۷۳/۰ ± ۷	۸۲/۵ ± ۷	۴۹/۰ ± ۶	۷۸/۰ ± ۱۱	۷۴/۰ ± ۷
۱۶۰	۷۰/۵ ± ۱۶	۷۸/۵ ± ۹	۷۷/۰ ± ۳	۶۱/۰ ± ۷	۸۲/۰ ± ۹	۷۴/۵ ± ۱۷
۲۰۰	۷۳/۲ ± ۶	۸۰/۰ ± ۸	۶۴/۵ ± ۴	۶۱/۰ ± ۵	۷۹/۵ ± ۵	۶۶/۰ ± ۱۱

جدول ۳. صحت طبقه‌بندی براساس ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن در تعداد ژن‌های مختلف انتخاب شده با انتخاب ویژگی از داده‌ی ویژگی توپولوژیک بینابینی

تعداد	توزیع درجه	درجه‌ی تمرکز	بینابینی	ضریب خوشه‌بندی	نزدیکی رئوس	گروه‌ی ویژه
۲۰	۹۲/۰ ± ۱	۹۲/۵ ± ۱	۲۲/۰ ± ۳۷	۹۱/۵ ± ۱	۹۲/۰ ± ۱	۹۱/۰ ± ۵
۳۰	۸۷/۵ ± ۱۲	۸۷/۵ ± ۱۲	۱۹/۰ ± ۳۸	۸۷/۰ ± ۱۲	۸۶/۰ ± ۱۳	۹۲/۴ ± ۸
۴۰	۹۳/۰ ± ۱	۹۳/۰ ± ۱	۱۸/۵ ± ۳۸	۹۲/۵ ± ۱	۹۲/۰ ± ۱	۹۴/۰ ± ۱
۵۰	۸۸/۰ ± ۱۲	۸۸/۰ ± ۱۲	۱/۵ ± ۱	۸۷/۰ ± ۱۲	۸۶/۰ ± ۱۳	۹۰/۰ ± ۱۳
۶۰	۷۲/۰ ± ۴۲	۶۵/۰ ± ۴۵	۲۲/۰ ± ۴۳	۸۶/۹ ± ۱۲	۶۴/۰ ± ۴۴	۶۵/۵ ± ۴۵
۷۰	۹۳/۵ ± ۱	۹۳/۰ ± ۱	۱/۱ ± ۷۵	۸۸/۰ ± ۱۲	۹۲/۰ ± ۱	۹۴/۰ ± ۲

جدول ۴. صحت طبقه‌بندی براساس ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن در تعداد ژن‌های مختلف انتخاب شده با انتخاب ژن از داده‌ی ویژگی توپولوژیک توزیع درجه و توسعه‌ی مجموعه‌ی ژن‌ها بر اساس همبستگی ژن‌ها از روی داده‌های درجه‌ی اتصال

تعداد	توزیع درجه	درجه‌ی تمرکز	بینابینی	ضریب خوشه‌بندی	نزدیکی رئوس	گروه‌ی ویژه
۲۰	۷۳ ± ۲۰	۷۴ ± ۱۹	۱۷/۵ ± ۲۰	۸۷ ± ۱۰	۷۳ ± ۲۰	۷۳ ± ۱۹
۷۱	۹۰ ± ۱۳	۹۰ ± ۱۳	۲/۰ ± ۱	۸۸ ± ۱۲	۸۸ ± ۱۲	۹۱ ± ۱۲

بردار پشتیبان با هسته (Kernel) چند جمله‌ای استفاده شد. مطابق نتایج جداول ۳ و ۴، بیشترین میانگین صحت طبقه‌بندی توسط ویژگی، توزیع درجه و ویژه بودن گره (ژن) به دست آمده است. در جداول ۵ و ۶ نتایج طبقه‌بندی k-NN با اختلاف اندک بین مقادیر صحت طبقه‌بندی با ویژگی درجه‌ی تمرکز ژن و ویژه بودن گره، تنها برای ویژگی درجه‌ی تمرکز ژن در نظر گرفته شد. در جداول ۵ و ۶، میانگین و انحراف معیار صحت طبقه‌بندی حاصل از ارزیابی مقاطع با اعمال طبقه‌بندی کننده‌ی SVM و k-NN برای حالتی که انتخاب ویژگی قبل از بازسازی شبکه انجام شده، نشان داده شده است. در جداول ۷ و ۸ نتایج مشابه برای حالتی که انتخاب ویژگی پس از بازسازی شبکه بر ویژگی‌های توپولوژی انجام شد، گزارش گردید.

مطابق جداول ۳ و ۴، ژن‌های شاخص عود سرطان سینه که بر اساس ویژگی‌های توپولوژیک انتخاب شدند، صحت پیش‌گویی مناسب‌تری نسبت به شاخص‌های مبتنی بر بیان ژن دارند. اکنون باید ژن‌های انتخابی از نظر آنتولوژی نیز تحلیل گردد تا نقش آن‌ها در بروز پدیده‌ی عود بهتر مشخص شود. ارزیابی آنتولوژی ژن‌ها در سه سطح جزء سلولی، فرایند زیستی و عملکرد در سطح مولکولی توسط نرم‌افزار EASE نسخه‌ی ۲ (۳۱) انجام گرفت. نتایج حاصل از تحلیل آنتولوژی بر روی ژن‌های به دست آمده با اعمال انتخاب ویژگی قبل از ساخت شبکه، انتخاب با معیار ویژگی توپولوژی بینابینی و ویژگی توزیع درجه به ترتیب در شکل‌های ۶-۴ نمایش داده شده است. در این شکل‌ها تعداد ژن‌های شاخصی که در هر یک از شاخه‌های آنتولوژی مختلف قرار گرفته است، مشخص گردید.

در مرحله‌ی دوم ارزیابی که نتایج آن در جدول ۳ گزارش شده است، برای ساخت شبکه‌ی ژن از ۲۰۰ ژن داده‌ی ویژگی توپولوژیک استفاده گردید و در مرحله‌ی طبقه‌بندی تنها از ژن‌های انتخاب شده بر اساس ویژگی‌های توپولوژیک بهره گرفته شد. لازم به ذکر است که در این مرحله نیز طبقه‌بندی بر اساس آستانه‌گذاری همبستگی بین ویژگی‌های توپولوژی در دو شبکه انجام گرفت. تنها تفاوت در روش حصول جداول ۲ و ۳ که اختلاف زیادی از نظر نتایج دارند، جابه‌جایی مرحله‌ی انتخاب ویژگی از مرحله‌ی قبل از ساخت شبکه به پس از ساخت شبکه است. به عبارت دیگر، رتبه‌بندی آن‌ها در جدول ۲ بر اساس مقدار بیان ژن و در جدول ۳ بر اساس ویژگی‌های توپولوژی انجام گرفته است.

ارزیابی دیگری به منظور بررسی تأثیر انتخاب ویژگی مبتنی بر ویژگی‌های توپولوژی انجام گرفت. در این ارزیابی که نتایج آن در جدول ۴ گزارش شده است، ابتدا ۲۰ ژن از شبکه‌ی ساخته شده از کل ژن‌ها بر اساس رتبه‌بندی ویژگی توزیع درجه انتخاب شد و سپس، ژن‌های متصل به این ۲۰ ژن (اتصال به معنی وجود ضریب همبستگی بالای ۰/۳۵ بین دو ژن) مطابق آنچه در ابتدای بخش شرح داده شد، انتخاب و بار دیگر شبکه‌ای با استفاده از مجموعه ژن‌های توسعه یافته (۷۱ ژن) از ابتدا ساخته شد. در انتها، با مقایسه‌ی همبستگی بین ویژگی‌های توپولوژی مختلف در شبکه‌های بازسازی شده با استفاده از مجموعه‌ی توسعه یافته، مقدار صحت طبقه‌بندی محاسبه گردید و مطابق جدول ۴ گزارش شد. به منظور بهبود بیشتر مقدار صحت طبقه‌بندی در مرحله‌ی بعدی ارزیابی، به جای آستانه‌گذاری خطی از طبقه‌بندی کننده‌های غیر خطی k-NN و ماشین

جدول ۵. صحت طبقه‌بندی k-NN (k-nearest neighbor) در تعداد ژن‌های مختلف انتخاب شده با انتخاب ژن از داده‌ی ویژگی توپولوژیک بینابینی

تعداد	توزیع درجه	درجه‌ی تمرکز	بینابینی	ضریب خوشه‌بندی	نزدیکی رئوس	گره‌ی ویژه
۲۰	۹۹/۹ ± ۰/۰۵	۹۹/۹ ± ۰/۰۵	۵۵/۰ ± ۲۴	۹۹/۹ ± ۰/۰۵	۹۹/۹ ± ۰/۰۵	۹۹/۹ ± ۰/۰۵
۳۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۱/۵ ± ۲۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۴۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۵/۰ ± ۲۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۰/۵ ± ۸	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۶۰	۹۱/۰ ± ۱۹	۹۱ ± ۱۹	۴۰/۵ ± ۸	۹۱/۰ ± ۱۹	۸۹/۰ ± ۲۵	۸۶/۰ ± ۲۷
۷۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۴/۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۶. صحت طبقه‌بندی SVM (Support vector machines) در تعداد ژن‌های مختلف انتخاب شده با انتخاب ژن از داده‌ی ویژگی توپولوژیک بینابینی

تعداد	توزیع درجه	درجه‌ی تمرکز	بینابینی	ضریب دی	نزدیکی رئوس	گره‌ی ویژه
۲۰	۹۹/۹۵ ± ۰/۰۵	۱۰۰	۵۴/۰ ± ۲۲	۱۰۰	۹۹/۹ ± ۰/۱	۹۹/۹ ± ۰/۱۰
۳۰	۱۰۰	۹۸/۹ ± ۱/۵	۵۱/۵ ± ۲۷	۱۰۰	۱۰۰	۹۹/۹۸ ± ۰/۰۴
۴۰	۹۹/۹۵ ± ۰/۰۵	۹۸/۹ ± ۱/۵	۵۵/۰ ± ۲۴	۱۰۰	۱۰۰	۹۹/۹ ± ۰/۲۵
۵۰	۱۰۰	۹۸/۹ ± ۱/۷	۴۰/۵ ± ۸	۱۰۰	۱۰۰	۹۹/۸ ± ۰/۳۰
۶۰	۸۹/۰ ± ۲۱/۰۰	۸۴/۵ ± ۱۹/۰	۳۱/۰ ± ۳۱	۸۹ ± ۲۱	۸۶/۰ ± ۲۷/۰	۸۶/۰ ± ۲۷/۰۰
۷۰	۹۹/۹ ± ۰/۱۰	۹۷/۹ ± ۲/۵	۴۴/۴	۱۰۰	۱۰۰	۹۹/۶ ± ۰/۷۰

جدول ۸. صحت طبقه‌بندی توسط SVM (Support vector machines)

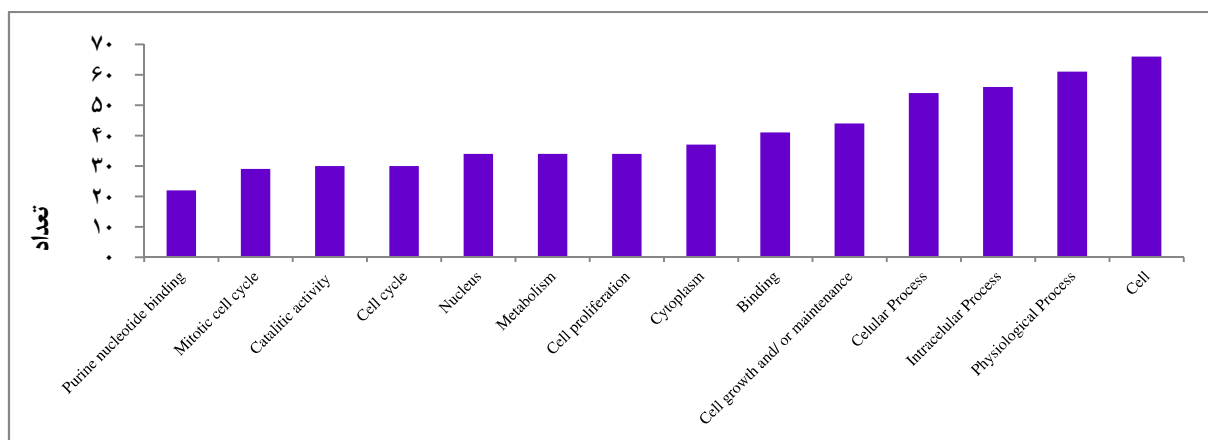
در تعداد ژن‌های مختلف انتخاب شده با انتخاب ژن از داده‌ی بیان ژن

تعداد ژن	صحت
۶۰	۶۴/۵ ± ۲
۷۰	۶۶/۰ ± ۱
۸۰	۶۷/۰ ± ۳
۹۰	۶۸/۰ ± ۲
۱۰۰	۶۷/۵ ± ۱
۱۲۰	۶۷/۰ ± ۳
۱۴۰	۶۷/۰ ± ۲
۱۶۰	۶۹/۰ ± ۴
۲۰۰	۶۴/۰ ± ۵

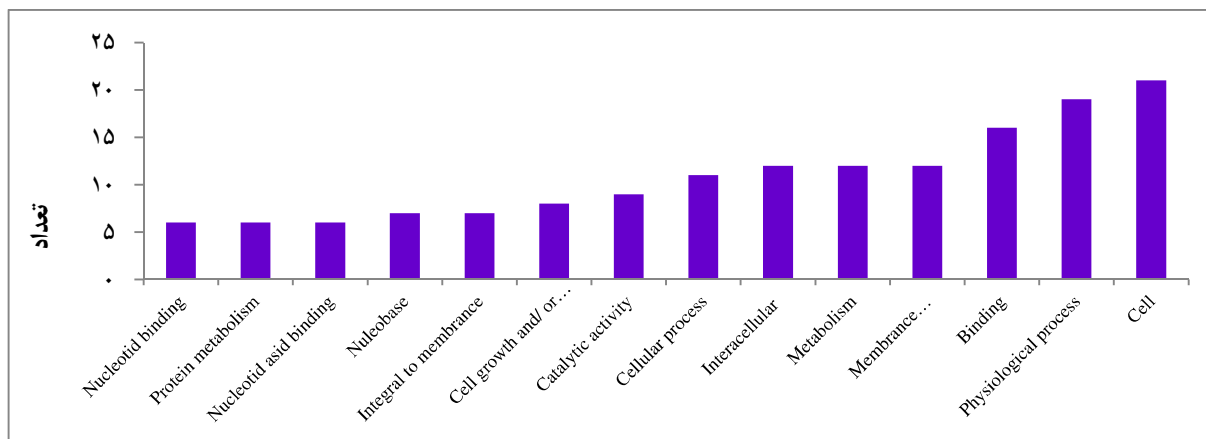
جدول ۷. صحت طبقه‌بندی توسط k-NN (k-nearest neighbor)

در تعداد ژن‌های مختلف انتخاب شده با انتخاب ژن از داده‌ی بیان ژن

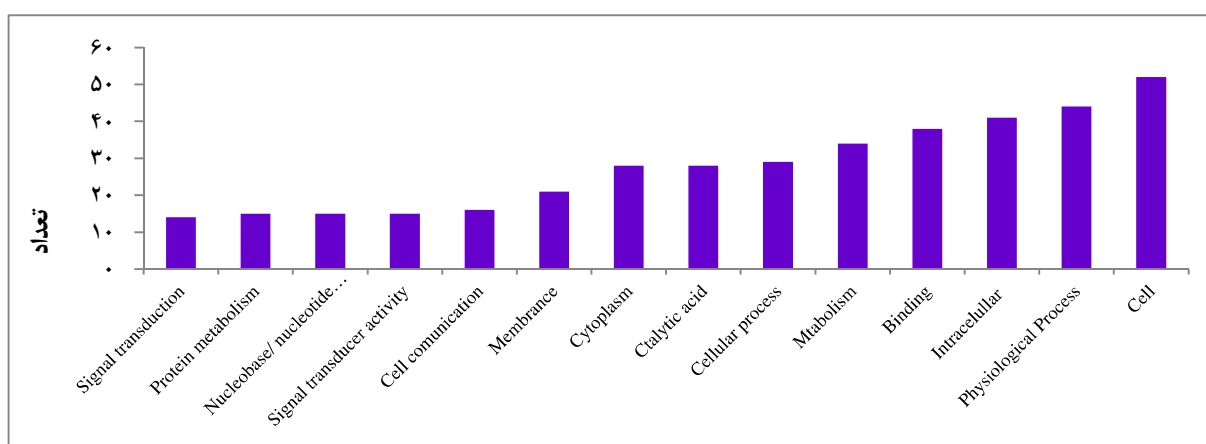
تعداد ژن	صحت
۶۰	۷۰ ± ۳
۷۰	۷۰ ± ۱
۸۰	۷۰ ± ۳
۹۰	۶۷ ± ۵
۱۰۰	۷۱ ± ۱
۱۲۰	۶۹ ± ۳
۱۴۰	۷۱ ± ۲
۱۶۰	۷۵ ± ۴
۲۰۰	۷۲/۵ ± ۵



شکل ۴. هستی‌شناسی ژن‌ها بر اساس انتخاب ویژگی از داده‌ی بیان ژن



شکل ۵. هستی‌شناسی ژن‌ها بر اساس انتخاب ویژگی از داده‌ی ویژگی توپولوژیک بینابینی



شکل ۶. هستی‌شناسی ژن‌ها بر اساس انتخاب ویژگی از داده‌ی ویژگی توپولوژیک درجه و توسعه‌ی مجموعه ژن‌ها بر اساس اطلاعات درجه‌ی

اتصال ژن‌ها

طبقه‌بندی کننده‌های غیر خطی (SVM و k-NN) را نسبت به یک روش خطی در تولید نتایج مبتنی بر انتخاب ویژگی از داده‌ی بیان ژن با افزایش خفیف در صحت طبقه‌بندی (جدول ۲) را نشان می‌دهد. جداول ۷ و ۸ نیز نشان دهنده‌ی مزیت کاربرد طبقه‌بندی کننده‌ی غیر خطی در کاربرد ویژگی‌های توپولوژیک برای طبقه‌بندی نسبت به طبقه‌بندی کننده‌ی خطی (جدول ۳) می‌باشد. مقایسه‌ی نتایج جداول ۵ و ۷ نیز تأیید دوباره‌ای بر مزیت کاربرد ویژگی‌های توپولوژیک در افزایش صحت طبقه‌بندی نمونه‌ها است.

طبقه‌بندی نمونه‌های سرطانی بر اساس ویژگی‌های توپولوژیک شبکه‌ی ژن پیش‌تر در مطالعات Liu و همکاران (۱۷-۱۶) به طور مشابه از نظر بهره‌گیری از ساخت شبکه‌ی ژن و استخراج برخی ویژگی‌های توپولوژیک مورد بررسی قرار گرفته است. تفاوت مطالعه حاضر نسبت به مطالعات قبلی را می‌توان در مورد خاص مورد بررسی (پیش‌گویی عود سرطان سینه)، مرحله و معیار انتخاب ویژگی

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، استفاده از ویژگی‌های توپولوژیک در جهت رتبه‌بندی ژن‌ها و مشارکت آن‌ها در مدل طبقه‌بندی کننده بر اساس همبستگی بین شبکه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه‌ی نتایج جداول ۲ و ۳ نشان داد که ویژگی‌های توپولوژیک معیار مناسبی برای انتخاب ژن است و در جهت افزایش صحت طبقه‌بندی نمونه‌ها و کاهش بعد قبل از ساخت شبکه به منظور دستیابی به نتایج پایدار و کاهش هزینه‌ی محاسباتی مؤثر می‌باشد، اما اگر حذف ژن‌ها با معیار مناسبی انجام نگیرد، منجر به تغییر ویژگی‌های توپولوژیک و مخدوش شدن نتایج نهایی خواهد شد. همچنین، با یک بررسی از انتها به ابتدا، استفاده از توزیع درجه و انتخاب ژن‌های متصل به ژن‌های شاخص به عنوان معیار مناسبی در کاهش بعد مسئله با کمترین اثر سوء بر نتایج معرفی شد. مقایسه‌ی یافته‌های جداول ۳ و ۴ کاهش صحت طبقه‌بندی را مشخص نمود. نتایج جداول ۵ و ۶ تأثیر مثبت کاربرد

ساخت شبکه‌ی ژن از روی پروفایل بیان ژن در میکروآرایه، می‌تواند نتایج مطمئن‌تری ارائه دهد.

بر اساس ارزیابی و تحلیل آنتولوژی ژن‌های شاخص به دست آمده از روش پیشنهاد شده در مطالعه‌ی حاضر (شکل‌های ۴-۲)، می‌توان در مورد نقش کارکردی ژن‌های شاخص و انطباق آن‌ها با کارکردهای دخیل در سرطان اظهار نظر کرد. از این نظر، با مبنا قرار دادن ویژگی توپولوژی بینایی نسبت به ویژگی توزیع درجه‌ی انطباق بیشتر با کارکرد سلول‌های سرطانی شناخته شده، مشاهده می‌شود که این انطباق از نظر کلی مشابه حالتی می‌باشد که انتخاب ویژگی به طور مستقیم قبل از ساخت شبکه انجام گرفته است. نتیجه این تحلیل قابلیت تفسیر بیولوژی ژن‌های استخراج شده به عنوان شاخص پیش‌گویی را بیان می‌کند.

هدف بعدی در راستای ادامه این مطالعه، بررسی و مقایسه‌ی نتایج صحت طبقه‌بندی و تحلیل آنتولوژی آن‌ها با بهره گرفتن از سایر روش‌های ساخت شبکه است. همچنین، در ادامه‌ی تحقیق حاضر و با توجه به تحلیل ضرایب همبستگی بین شبکه‌های ژن متناظر با دو گروه مورد مطالعه، پیشنهاد می‌شود روش مناسب‌تری به جز تحلیل ضرایب همبستگی به منظور طبقه‌بندی یک نمونه آزمایش ارائه شود.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از پروژه‌ی پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره‌ی ۳۹۴۰۸۶ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی به جهت تأمین هزینه‌ی اجرای پروژه قدردانی می‌گردد.

و تعداد گروه‌های نمونه‌ها عنوان کرد. در مطالعه‌ی Liu و همکاران، انتخاب ژن و کاهش بعد قبل از ساخت شبکه‌ی ژن و از روی داده‌ی بیان ژن صورت گرفته بود (۱۷-۱۶)، اما در مطالعه‌ی حاضر انتخاب ژن‌های شاخص پس از ساخت شبکه‌ی ژن و از روی ویژگی‌های توپولوژیک انجام شد.

میانگین صحت طبقه‌بندی به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر پس از کاربرد k-NN (۹۸/۵ درصد) و SVM (۹۶/۵ درصد) نسبت به مقدار حاصل از روش Liu و همکاران (۱۷-۱۶) در داده‌های مشابه، از داده‌های بیان ژن نمونه‌های سرطانی به ترتیب برای طبقه‌بندی کننده‌های k-NN (۷۰/۶ درصد) و SVM (۶۶/۷ درصد) بیشتر بود. در پژوهش Yang و همکاران از دو مجموعه داده‌ی سرطان سینه‌ی گروه مورد و شاهد، شبکه‌های ژنی بازسازی شدند که بعد از آن با تفاضل دو شبکه‌ی ژن، شبکه‌ی تفاضلی تشکیل شده بود (۱۹). آن‌ها از روی شبکه‌ی تفاضلی ایجاد شده، ژن‌ها را بر اساس مقدار ویژگی درجه (ژن‌های با درجه‌ی اتصال بزرگ‌تر از ۵) و P رتبه‌بندی کردند (۱۹) که مانند مطالعه‌ی حاضر، ویژگی توزیع درجه را یکی از معیارهای انتخاب ژن در نظر گرفتند (۱۹). در مطالعه‌ی Ahn و همکاران برای طبقه‌بندی نمونه‌ی سرطانی از ساخت شبکه‌ی ژن استفاده گردید. به این صورت که آن‌ها از ژن‌های متناظر با شبکه‌های پروتئین (Protein-Protein interaction) PPI و برهم کنش ژنتیک (Genetic interactions یا GI) و آنالیز مسیرهای بیولوژیک در ساخت شبکه‌ی ژن استفاده نمودند (۲۱)، اما همان‌گونه که در ابتدا اشاره شد، شبکه‌های استاندارد پروتئینی با وجود ارایه‌ی اطلاعات ارزشمند، داده‌های کاملی نیستند و عاری از خطا نمی‌باشند. بنابراین،

References

1. Tahergorabi Z, Moodi M, Mesbahzadeh B. Breast cancer: A preventable disease. J Birjand Univ Med Sci 2014; 21(2): 126-41. [In Persian].
2. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res 2005; 65(16): 7065-70.
3. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002; 415(6871): 530-6.
4. Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, de Fraipont F, Lantuejoul S, Frappat V, et al. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. Eur Respir J Suppl 2003; 39: 36s-44s.
5. Brennan DJ, O'Brien SL, Fagan A, Culhane AC, Higgins DG, Duffy MJ, et al. Application of DNA microarray technology in determining breast cancer prognosis and therapeutic response. Expert Opin Biol Ther 2005; 5(8): 1069-83.
6. Rapaport F, Zinovyev A, Dutreix M, Barillot E, Vert JP. Classification of microarray data using gene networks. BMC Bioinformatics 2007; 8: 35.
7. Brazhnik P, de la Fuente A, Mendes P. Gene networks: how to put the function in genomics. Trends Biotechnol 2002; 20(11): 467-72.
8. Curtis RE, Yuen A, Song L, Goyal A, Xing EP. TVNViewer: an interactive visualization tool for exploring networks that change over time or space. Bioinformatics 2011; 27(13): 1880-1.
9. Butte AJ, Kohane IS. Mutual information relevance networks: functional genomic clustering using pairwise entropy measurements. Pac Symp Biocomput 2000; 418-29.
10. Akutsu T, Miyano S, Kuhara S. Identification of genetic networks from a small number of gene expression patterns under the Boolean network model. Pac Symp Biocomput 1999; 17-28.
11. Gevaert O, De SF, Timmerman D, Moreau Y, De MB. Predicting the prognosis of breast cancer by integrating

- clinical and microarray data with Bayesian networks. *Bioinformatics* 2006; 22(14): e184-e190.
12. Sakamoto E, Iba H. Inferring a system of differential equations for a gene regulatory network by using genetic programming. *Proceedings of the 2001 Congress on Evolutionary Computation*; 2001 May 27-30; Seoul, South Korea.
 13. Hirose O, Yoshida R, Imoto S, Yamaguchi R, Higuchi T, Charnock-Jones DS, et al. Statistical inference of transcriptional module-based gene networks from time course gene expression profiles by using state space models. *Bioinformatics* 2008; 24(7): 932-42.
 14. Vohradsky J. Neural network model of gene expression. *FASEB J* 2001; 15(3): 846-54.
 15. Segal E, Shapira M, Regev A, Peer D, Botstein D, Koller D, et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat Genet* 2003; 34(2): 166-76.
 16. Liu CC, Chen WSE, Chang PC, Chen JJW. Topological-based classification using artificial gene networks. *Proceedings of 4th IEEE Conference on Cognitive Informatics*; 2005 Aug 8-10; Irvine, USA.
 17. Liu CC, Chen WS, Lin CC, Liu HC, Chen HY, Yang PC, et al. Topology-based cancer classification and related pathway mining using microarray data. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(14): 4069-80.
 18. Raza K, Jaiswal R. Reconstruction and analysis of cancer-specific generegulatory networks from gene expression profiles. *International Journal on Bioinformatics and Biosciences* 2013; 3(2): 25-34.
 19. Yang B, Zhang J, Yin Y, Zhang Y. Network-based inference framework for identifying cancer genes from gene expression data. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 401649.
 20. Chuang HY, Lee E, Liu YT, Lee D, Ideker T. Network-based classification of breast cancer metastasis. *Mol Syst Biol* 2007; 3: 140.
 21. Ahn J, Yoon Y, Park C, Shin E, Park S. Integrative gene network construction for predicting a set of complementary prostate cancer genes. *Bioinformatics* 2011; 27(13): 1846-53.
 22. Bockmayr M, Klauschen F, Györfy B, Denkert C, Budczies J. New network topology approaches reveal differential correlation patterns in breast cancer. *BMC Syst Biol* 2013; 7: 78.
 23. Muszynski M, Osowski S. Data mining methods for gene selection on the basis of gene expression arrays. *Int J Appl Math Comput Sci* 2014; 24(3): 657-68.
 24. Wang Y, Yao M, Yang J. NIM: a node influence based method for cancer classification. *Comput Math Methods Med* 2014; 2014: 826373.
 25. Teng CY, Lin YR, Adamic L. Recipe recommendation using ingredient networks. *Proceedings of Web Science*; 2012 Jun 22-24; Evanston, IL, USA.
 26. Moradi M, Shafiee Sardasht M, Ebrahimipour M. Bankruptcy prediction by support vector machines and multiple discriminate analysis models. *Journal of Scurities Exchang* 2012; 18(5): 113-36. [In Persian].
 27. Sutton O. Introduction to k nearest neighbour classification and condensed nearest neighbour data reduction [Online]. [cited 2012 Feb]; Available from: URL:http://www.math.le.ac.uk/people/ag153/homepage/KNN/OliverKNN_Talk.pdf
 28. Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik V. Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Machine Learning* 2002; 46(1-3): 389-422.
 29. Refaiehzadeh P, Tang L, Liu H. Cross validation. *Proceedings of AAAI Workshop on Evaluation Methods for Machine Learning II*; 2007 Jul 22-23; Vancouver, Canada.
 30. Drozdov I, Ouzounis CA, Shah AM, Tsoka S. Functional Genomics Assistant (FUGA): a toolbox for the analysis of complex biological networks. *BMC Res Notes* 2011; 4: 462.
 31. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 2003; 4(10): R70.

Dimensionality Reduction on Topological Features of the Gene Network Constructed from Microarray Data for Prediction of Breast Cancer Recurrence

Alireza Mehridehnavi PhD¹, Hamed Zand², Mohammadreza Sehhati PhD³

Original Article

Abstract

Background: Extracted features from gene expression profiles of DNA microarrays are traditional tools in cancer classification. In this regard, using topological properties of genes through the gene network reconstruction can provide more reliable findings. The main goal of this article is the prediction of breast cancer recurrence via using topological features of the relevance network reconstructed from gene expression profiles.

Methods: We utilized seven gene expression microarray datasets, including 1271 samples from seven studies on breast cancer. In this study, the relevance gene network was reconstructed and FDA (Fisher Discriminant Analysis) method was applied for gene selection based on the characteristics of the network topology. To construct the gene network, we needed a profile of expressions for each gene and it could not be obtained from a single sample. Therefore, to classify a test sample, this sample was added to the training data and new gene networks were reconstructed according to two groups of high- and low-risk samples. The correlation coefficient between topological quantity vectors of the networks before and after adding test sample was calculated. The test sample was classified to the group that corresponded to higher correlation between new reconstructed network and the primary labeled network.

Findings: The classification accuracy was calculated using 5-fold cross-validation based on both correlation threshold and k-nearest neighbor (kNN) classifier and non-linear support vector machines (SVM) classifier that were applied on the topological properties of reconstructed gene networks. The results confirmed the advantage of applying topological features to the kNN and the non-linear SVM classifiers. The highest accuracy in prediction with the kNN classifier was obtained via degree centrality property that reached 98.5% in average among various numbers of genes.

Conclusion: Topological features of reconstructed gene networks from gene expression profiles provided more stable and accurate results in prediction of breast cancer recurrence.

Keywords: Breast cancer, Gene expression, Gene regulatory networks, Topology

Citation: Mehridehnavi A, Zand H, Sehhati M. **Dimensionality Reduction on Topological Features of the Gene Network Constructed from Microarray Data for Prediction of Breast Cancer Recurrence.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(359): 1973-85

1- Associate Professor, Department of Biomedical Engineering (Bioelectronics), School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- MSc Student, Department of Biomedical Engineering (Bioelectronics), School of Advanced Medical Technology AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mohammadreza Sehhati PhD, Email: mr.sehhati@gmail.com

شناسایی مولکولی گونه‌های Candida در بیماران مبتلا به Candidiasis در بیرجند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و برش آنزیمی

تکتم بخشی^۱، دکتر سمیرا سالاری^۲، دکتر علی ناصری^۳، دکتر ایرج اسفندیارپور^۴، محمد علی محمدی^۵، پویا قاسمی‌نژاد آلمانی^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، بروز عفونت‌های فرصت طلب قارچی مانند Candidiasis به خصوص در بیماران دچار نقص ایمنی، به طور قابل توجهی افزایش یافته است. شناسایی سریع و دقیق ایزوله‌های Candida جهت درمان‌های ضد قارچی و مدیریت عفونت‌های بیمارستانی مؤثر است. هدف از این مطالعه، شناسایی مولکولی گونه‌های Candida در بیماران مبتلا به Candidiasis در بیمارستان ولی عصر (عج) بیرجند بود.

روش‌ها: ۹۸ جدایه‌ی Candida از ۹۰ بیمار مبتلا به Candidiasis در طول دوره‌ی یک ساله، از آذر ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۳ به دست آمد. این جدایه‌ها در محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar حاوی کلرامفنیکل در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مشدت ۴۸ ساعت و روی محیط CHROMagar، Candida در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت برای تولید رنگ خاص هر گونه کشت داده شد. سپس، شناسایی گونه‌های Candida با استفاده از روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) با آنزیم‌های محدودلاثر Msp I انجام شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۹۸ جدایه‌ی Candida از نمونه‌های بالینی مختلف جدا و با روش PCR-RFLP با استفاده از Msp I تعیین گونه شدند. گروه سنی نوزادی تا ۱۰ سال، بیشترین فراوانی ابتلا به Candidiasis را داشتند. در بین نمونه‌های بالینی، بیشترین جدایه‌های Candida از ادرار جدا شد (۸۳/۸۶ درصد). شایع‌ترین جدایه‌ها شامل Candida albicans ۴۱ مورد (۴۱/۸۴ درصد) و پس از آن Candida glabrata ۱۶ مورد (۱۶/۳۲ درصد)، Candida tropicalis ۱۲ مورد (۱۲/۲۴ درصد)، Candida krusei ۱۰ مورد (۱۰/۲۰ درصد)، Candida parapsilosis ۸ مورد (۸/۱۶ درصد)، Candida lusitanae ۷ مورد (۷/۱۴ درصد)، Candida guilliermondii و Candida kefir هر کدام ۲ مورد (۲/۰۴ درصد) بودند.

نتیجه‌گیری: استفاده از روش PCR-RFLP با آنزیم‌های محدودلاثر Msp I روشی آسان، سریع و قابل اعتماد برای شناسایی گونه‌های Candida است.

واژگان کلیدی: گونه‌های Candida، Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)، Msp I

ارجاع: بخشی تکتم، سالاری سمیرا، ناصری علی، اسفندیارپور ایرج، محمدی محمد علی، قاسمی‌نژاد آلمانی پویا. شناسایی مولکولی گونه‌های Candida در بیماران مبتلا به Candidiasis در بیرجند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و برش آنزیمی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۹۳-۱۹۸۶

و مزمن در پوست، ناخن، مخاط دهان، واژن، برنش، ریه و دستگاه گوارش ظاهر می‌گردد و در فرم سیستمیک، سایر اعضای بدن از قبیل کلیه، کبد، قلب و سایر قسمت‌های بدن را درگیر می‌سازد (۲). به طور عمده، گونه‌های بیماری‌زا شامل Candida albicans.

مقدمه

Candidiasis، طیفی از بیماری‌های قارچی فرصت طلب است که در افراد مستعد به شکل عفونت‌های سطحی ساده تا عفونت‌های سیستمیک ایجاد می‌شود (۱). این عفونت به صورت حاد، تحت حاد

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
- ۲- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
- ۳- استادیار، گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی، بیمارستان قائم (عج)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۴- استاد، گروه بیماری‌های پوست، مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
- ۵- مربی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
- ۶- دانشجوی دکتری، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

Email: sa_salari@kmu.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سمیرا سالاری

(Internal transcribed spacer) در گونه‌های مختلف متفاوت است. این ناحیه بین ژن 18S و 28S rDNA قرار گرفته است. اختلاف اندازه و توالی این ناحیه، به تعیین هویت مخمرها در سطح گونه کمک می‌کند (۱۰). هدف از انجام این مطالعه، تعیین گونه‌های *Candida* جدا شده از نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران بستری در بیمارستان ولی‌عصر (عج) بیرجند با استفاده از روش PCR-RFLP بود.

روش‌ها

تهیه‌ی ایزوله‌های *Candida*: از ۹۰ بیمار بستری شده در بیمارستان ولی‌عصر (عج) بیرجند که به آزمایشگاه میکروبیولوژی این بیمارستان ارجاع شده بودند، ۹۸ جدایه‌ی *Candida* طی یک سال، از آذر ۱۳۹۲ تا آذر ۱۳۹۳، جمع‌آوری شد و پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران، اطلاعات آن‌ها (جنس، سن، محل ضایعه، محل ابتلا و غیره) در پرسش‌نامه ثبت شد. جدایه‌ها در محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) در لوله‌ی دربیچ‌دار نگهداری شد. سپس به محیط سابورو آگار جدید منتقل گردید و پس از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، از آن برای انجام آزمایش‌های مولکولی استفاده شد.

استخراج DNA و انجام PCR-RFLP: در این مرحله، DNA جدایه‌ی *Candida* با به کارگیری کیت استخراج (GeneAll Biotechnology) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. یکی از بهترین روش‌های مورد استفاده جهت شناسایی و تشخیص قارچ‌ها از جمله مخمرها به کمک روش‌های مولکولی، بررسی مناطق ITS می‌باشد. یکی از گزینه‌های مناسب، انتخاب مناطق ITS1-5.8S-ITS2 از ژن‌های RNA ریبوزومی قارچ‌ها است که توسط پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4 تکثیر می‌گردد. لازم به ذکر است که pITS1 و pITS4 مناطق ITS1 و ITS2 را به طور کامل پوشش می‌دهد.

برای شناسایی گونه‌های مهم کاندیدا از جمله *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* و ...، قسمتی از DNA ریبوزومال (rDNA یا Ribosomal DNA) *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* به نام ITS1-5.8S-ITS2 هدف تکثیر توسط PCR قرار گرفت. پرایمر ITS1 به عنوان پرایمر رفت و پرایمر ITS4 به عنوان پرایمر برگشت به کار گرفته شد. توالی این آغازگرها (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') و ITS1 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') بود. برای انجام آزمایش PCR مخلوط واکنش در حجم نهایی

Candida glabrata, *Candida famata*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida kefir*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae* و *Candida parapsilosis* می‌باشند (۳). عوامل زمینه‌ساز جهت ابتلا شامل سرطان، لوسمی، جراحی، دیابت ملیتوس، درمان‌های طولانی مدت با آنتی‌بیوتیک‌ها، کورتیکو استروئیدها، داروهای سرکوب کننده‌ی ایمنی، ابتلا به ایدز، بارداری، سوختگی و دریافت پیوند است. طیف این عفونت‌ها از کلونیزاسیون مخاطی تا عفونت‌های مهاجم و کشنده، متغیر است. از میان اشکال بالینی مختلف عفونت‌های *Candida*، *Candidiasis* جلدی و مخاطی، از شیوع بالاتری برخوردارند. *Candidiasis* وازینال و برفک دهان در بین اشکال مخاطی و در فرم جلدی، عفونت ناخن (Onychomycosis) شایع‌تر هستند (۴-۶).

تشخیص دقیق *Candida* تا سطح گونه، از آن رو مهم است که درمان عفونت‌های *Candida* به صورت موضعی یا سیستمیک با داروهایی مثل پلی‌ان‌ها و آزول‌ها انجام می‌شود و عوامل ضد قارچی تأثیر متفاوتی علیه گونه‌های مختلف *Candida* دارند (۷). روش‌های مختلفی برای تعیین عوامل بیماری‌زا که بیشتر آن‌ها بر اساس مشخصات فنوتیپی مثل مورفولوژی کلونی و آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمی (الگوی جذب و تخمیر قندها) وجود دارد. با وجود دقت و اعتبار این روش‌ها وقت گیر هستند و برای تعیین بعضی گونه‌ها کافی نیستند. بنا بر این، روش‌های جدیدتری از فنون مولکولی مورد توجه قرار گرفته‌اند که استفاده از آن‌ها نیازمند هزینه‌ی بیشتری است؛ اما صحت، دقت بیشتر و سرعت آن‌ها غیر قابل انکار می‌باشد. انواع روش‌ها و تکنیک‌های مولکولی مانند

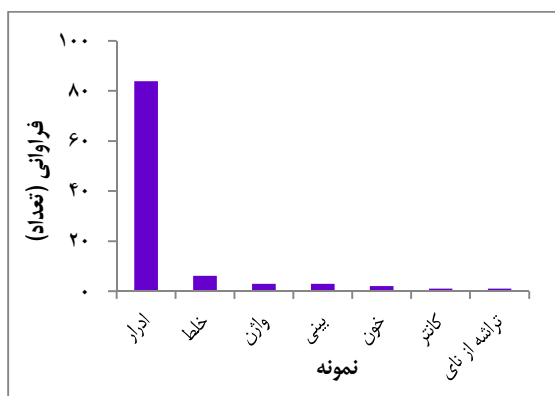
PCR (Polymerase chain reaction), PCR-RFLP, AFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), RAPD (Amplified fragment length polymorphism), Multiplex PCR (Random amplified polymorphic DNA), SSCP, DNA sequencing, Real-time PCR, Nested PCR (Single-strand conformation polymorphism) و DNA-fingerprinting در شناسایی گونه‌های *Candida* مناسب هستند (۸). بعضی از تکنیک‌های مدرن مثل Multiplex PCR و Real-time PCR به تجهیزات گران و اختصاصی نیاز دارند، در حالی که PCR-RFLP به نسبت ساده و آسان است و الگوی به دست آمده قابل تشخیص، قابل تکرار و قابل اعتماد است (۹).

DNA ریبوزومی دارای چند ناحیه‌ی متعدد می‌باشد. اندازه‌ی نواحی 5.8S، 18S و 26S به طور معمول در گونه‌های مختلف *Candida* برابر است، اما اندازه‌ی ناحیه‌ی ITS

به دست آمدند که بر اساس شکل ۲، بیشترین میزان جداسازی جدایه‌ها به ترتیب از ادرار (۸۳/۸۶ درصد) و بعد خلط (۶/۱۰ درصد) و کمترین آن از کاتتر و تراشه از نای هر کدام (۱/۰۲ درصد) بود. بر اساس جدول اندازه‌ی قطعات برشی حاصل از آنزیم *Msp I* بر روی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 در گونه‌های استاندارد *Candida* (جدول ۱).

فراوانی گونه‌های جدا شده به ترتیب *Candida albicans* ۴۱ مورد (۴۱/۸۴ درصد)، *Candida glabrata* ۱۶ مورد (۱۶/۳۲ درصد)، *Candida tropicalis* ۱۲ مورد (۱۲/۲۴ درصد)، *Candida parapsilosis* ۱۰ مورد (۱۰/۲۰ درصد)، *Candida lusitanae* ۷ مورد (۷/۱۴ درصد)، *Candida guilliermondii* و *Candida kefir* هر کدام ۲ مورد (۲/۰۴ درصد) بودند.

شکل ۳، الکتروفورز محصولات PCR برخی ایزوله‌های بالینی و شکل ۴ الکتروفورز محصولات RFLP بعد از اثر آنزیم *Msp I* در مطالعه‌ی حاضر را نشان می‌دهند. جدول ۲، فراوانی گونه‌های *Candida* جدا شده از نمونه‌های بالینی در این تحقیق را نشان می‌دهد. جدول ۳ فراوانی گونه‌های *Candida* جدا شده از نمونه‌های بالینی را بر حسب جنس نشان می‌دهد. بر اساس این جدول، همه‌ی ۸ گونه‌ی *Candida* از بیماران زن مورد مطالعه جدا شدند؛ در حالی که دو گونه‌ی *Candida guilliermondii* و *Candida kefir* از مردان مورد مطالعه جدا نشدند.



شکل ۲. فراوانی گونه‌های *Candida* جدا شده بر حسب نمونه‌ی بالینی

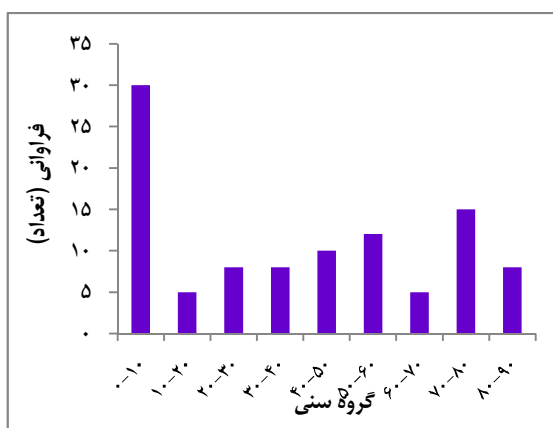
بحث

در دهه‌های اخیر، شیوع عفونت‌های فرصت طلب ناشی از مخمرهای *Candida* افزایش یافته است. عواملی مانند مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، کورتیکواستروئیدها و ابتلا به بیماری‌های ناتوان‌کننده مثل ایدز، دیابت ملیتوس، بدخیمی‌ها، کاربرد کاتترهای وریدی و پیوند اعضا از جمله زمینه‌های مساعد کننده‌ی ابتلا به عفونت‌های مخمری است (۱۲-۱۳).

۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر مستر میکس *Ampliqon* و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده تهیه شد. برنامه‌ی PCR در دستگاه ترمال سایکلر بر روی ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور جدا شدن دو رشته‌ی DNA (DNA Denaturation)، ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (Annealing)، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Extension) و در نهایت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Final extension) تنظیم شد. ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR هر کدام از ایزوله‌های کلینیک، در واکنش ۲۰ میکرولیتری RFLP حاوی ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم *Msp I* (شرکت Fermentas) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۱). در نهایت، پس از انجام الکتروفورز بر روی ژل ۲ درصد و بر اساس اندازه و تعداد باندهای به دست آمده، گونه‌های مختلف *Candida* تشخیص داده شد.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر، ۹۸ ایزوله از بیماران مبتلا به *Candidiasis* بستری در بیمارستان ولی عصر (عج) بیرجند جدا شد. این تحقیق شامل بررسی ۳۴ بیمار مرد (۳۷/۷۸ درصد) و ۵۶ بیمار زن (۶۲/۲۲ درصد) بود. حداقل سن بیماران، ۳ روز و حداکثر سن ۸۸ سال بود. بیشترین فراوانی در گروه سنی نوزادی تا ۱۰ سال و بعد از آن در گروه سنی ۷۱-۸۰ سال و کمترین فراوانی را در گروه سنی ۶۱-۷۰ سال و سپس ۱۱-۲۰ سال به دست آمد. شکل ۱ فراوانی موارد ابتلا به *Candidiasis* را در گروه‌های سنی مختلف نشان می‌دهد.



شکل ۱. فراوانی موارد ابتلا به *Candidiasis* در گروه‌های سنی مختلف

در این مطالعه، جدایه‌های *Candida* از نقاط مختلف بدن بیماران

جدول ۱. اندازه‌ی قطعات برشی حاصل از آنزیم *Msp I* بر روی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 در گونه‌های *Candida*

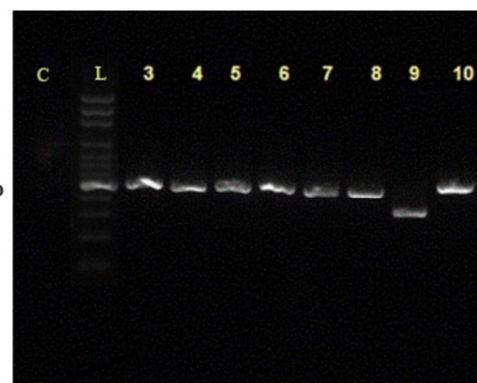
اندازه‌ی قطعه‌ی ITS1-ITS4	اندازه‌ی محصول هضم شده با آنزیم	گونه‌ی <i>Candida</i>
۵۳۵	۲۳۸ و ۲۹۷	<i>Candida albicans</i>
۵۲۰	۵۲۰	<i>Candida parapsilosis</i>
۵۲۴	۱۸۴ و ۳۴۰	<i>Candida tropicalis</i>
۵۱۰	۲۴۹ و ۲۶۱	<i>Candida krusei</i>
۶۰۸	۸۲ و ۳۷۱ و ۱۵۵	<i>Candida guilliermondii</i>
۸۷۱	۳۱۴ و ۵۵۷	<i>Candida glabrata</i>
۳۸۳	۲۶۶ و ۱۱۷	<i>Candida lusitaniae</i>
۷۲۱	۷۲۱	<i>Candida kefir</i>

جدول ۲. فراوانی گونه‌های *Candida* جدا شده از نمونه‌های بالینی

تعداد (درصد)	گونه‌ی <i>Candida</i>
۴۱ (۴۱/۸۴)	<i>Candida albicans</i>
۱۶ (۱۶/۳۲)	<i>Candida glabrata</i>
۱۲ (۱۲/۲۴)	<i>Candida tropicalis</i>
۱۰ (۱۰/۲۰)	<i>Candida krusei</i>
۸ (۸/۱۶)	<i>Candida parapsilosis</i>
۷ (۷/۱۴)	<i>Candida lusitaniae</i>
۲ (۲/۰۴)	<i>Candida guilliermondii</i>
۲ (۲/۰۴)	<i>candida kefir</i>
۹۸ (۱۰۰)	مجموع

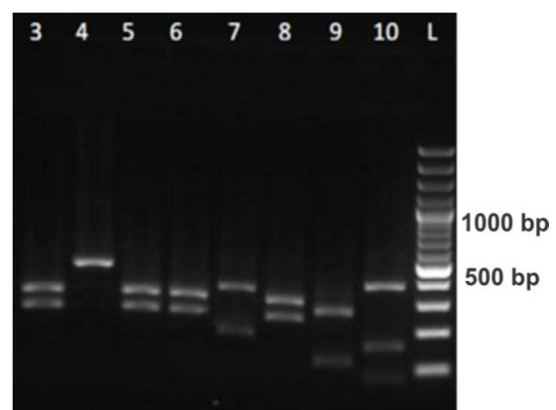
برای بررسی‌های تشخیصی، درمانی و اپیدمیولوژیک، تشخیص دقیق گونه‌های *Candida* ضروری است. روش‌های معمول، شامل کشت و یا مشاهده‌ی میکروسکوپی و استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی مثل جذب کربوهیدرات و مطالعات فنوتیپی می‌باشد. استفاده از این روش‌های معمول، اغلب هزینه‌بر و وقت‌گیر است و باعث شناسایی سه تا چهار گونه می‌شود (۱۴). در حالی که تشخیص سریع این گونه‌ها، عامل مهمی در درمان مبتلایان به *Candidiasis* به خصوص افراد در معرض خطر می‌باشد (۱۵).

با توجه به سهم رو به افزایش *Candida* غیر *albicans* در عفونت‌های *Candidiasis* و حساسیت متفاوت آن‌ها به داروهای ضد قارچی، تعیین گونه‌ی این مخمرها هم به منظور اهداف اپیدمیولوژیک و هم درمان مؤثرتر لازم است (۱۶). به عنوان مثال، حساسیت *Candida glabrata* و *Candida tropicalis* نسبت به فلوکونازول ۳۲-۴ برابر کمتر از *Candida albicans* است. همچنین، *Candida lusitaniae* دارای مقاومت نسبی ذاتی به آمفوتریسین می‌باشد (۱۷). یکی از روش‌های ساده، تکرار پذیر و قابل مقایسه که در آزمایش‌های تشخیصی کاربرد زیادی پیدا کرده است،



شکل ۳. الکتروفورز محصولات PCR

(Polymerase chain reaction) برخی ایزوله‌های بالینی گونه‌های کاندیدا، ۱۰-۳: جدا شده‌ی *Candida*. L: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (bp). C: شاهد منفی



شکل ۴. الکتروفورز محصولات RFLP

(Restriction fragment length polymorphism) با آنزیم *Msp I* برخی از ایزوله‌های مخمری. ۳، ۵، ۶ و ۸: *Candida albicans*. ۴: گونه‌ی *Candida parapsilosis*. ۷: گونه‌ی *Candida tropicalis*. ۹: گونه‌ی *Candida lusitaniae*. ۱۰: گونه‌ی *Candida guilliermondii* و L: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (bp)

جدول ۳. فراوانی گونه‌های *Candida* جدا شده از نمونه‌های بالینی بر حسب جنس

گونه‌ی <i>Candida</i>	مردان	زنان	مجموع
<i>Candida albicans</i>	۱۶	۲۶	۴۲
<i>Candida glabrata</i>	۵	۱۱	۱۶
<i>Candida tropicalis</i>	۵	۶	۱۱
<i>Candida krusei</i>	۴	۵	۹
<i>Candida parapsilosis</i>	۵	۴	۹
<i>Candida lusitaniae</i>	۲	۵	۷
<i>Candida kefir</i>	۰	۲	۲
<i>Candida guilliermondii</i>	۰	۲	۲
مجموع	۳۷	۶۱	۹۸

Candida albicans (بیشترین فراوانی)، *Candida glabrata*، *Candida parapsilosis*، *Candida krusei*، *Candida tropicalis* و *Candida lusitaniae*، *Candida guilliermondii* و *Candida kefir* بودند. البته لازم به ذکر است که همه‌ی ۸ گونه‌ی *Candida* شناسایی شده، از بیماران زن مورد مطالعه جدا شدند؛ در حالی که دو گونه‌ی *Candida guilliermondii* و *Candida kefir* از مردان مورد مطالعه جدا نشدند.

در مطالعه‌ی قه‌ری و همکاران، بیشترین فراوانی مربوط به *Candida albicans* (۴۵/۶ درصد) و سپس از آن *Candida parapsilosis* و *Candida tropicalis* و گونه‌های کمتر شایع شامل *Candida glabrata*، *Candida krusei*، *Candida kefir*، *Candida lusitaniae*، *Candida guilliermondii* و *Metschnikowia pulcherrima* گزارش شد (۱۶).

محمدی و همکاران در بررسی ۱۸۲ ایزوله‌ی *Candida albicans*، فراوانی *Candida albicans* را ۴۷/۲ درصد و فراوانی *Candida parapsilosis*، *Candida kefir*، *Candida tropicalis*، *Candida krusei* و *Candida glabrata* را به ترتیب ۱۰/۴، ۸/۲، ۷/۷ و ۷/۷ درصد و کمترین فراوانی را *Candida guilliermondii* با ۱/۶ درصد گزارش کردند (۱۰).

در بررسی ۸۵۵ نمونه‌ی کلینیک به روش RFLP-PCR، *Candida albicans* بیشترین فراوانی (۵۸/۶ درصد) و بعد از آن *Candida tropicalis*، *Candida glabrata*، *Candida parapsilosis* و *Candida kefir*، *Candida krusei*، *Candida orthopsilosis* و *Candida guilliermondii* معرفی شدند (۲۱).

در بررسی آیت‌اللهی موسوی و همکاران بر روی نمونه‌های جدا شده از دهان بیماران مبتلا به ایدز، فراوانی *Candida albicans* ۸۲/۲ درصد گزارش شد (۱۱). از میان آنزیم‌های محدودالانتر، آنزیم HaeIII

استفاده از روش هضم آنزیمی یا RFLP است که امکان شناسایی گونه‌ها را فراهم می‌کند. در این مطالعه، از روش PCR-RFLP جهت شناسایی گونه‌های *Candida* جدا شده از نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران بیمارستان ولی عصر (عج) بیرجند استفاده شد.

برای جداسازی دقیق گونه‌های مهم *Candida* در زمینه‌ی پزشکی و بیماری‌های عفونی، بهتر است که محصولات PCR را با آنزیم‌های مناسب برش زد. اساس RFLP، ایجاد قطعات DNA با استفاده از آنزیم محدودالانتر می‌باشد. آنزیم‌های محدودالانتر توالی خاصی از DNA را شناسایی می‌کنند و هضم آنزیمی صورت می‌گیرد. پس از هضم، قطعات برش یافته با اندازه‌های متفاوت ایجاد می‌شوند که به راحتی در ژل الکتروفورز قابل مشاهده هستند. تا کنون ۶ آنزیم برای تمایز ۱۲ مخمر شناخته شده‌ی کلینیک در سطح گونه استفاده شده اند که از طریق تکثیر زیر واحدهای کوچک 18S DNA ریبوزومی و شناسایی آن‌ها توسط PCR-RFLP به کار می‌روند (۱۸).

از آنزیم‌های مورد استفاده و کاربرد، می‌توان به چهار گروه از آنزیم‌های محدودالانتر مانند (MspI و CfoI، HaeIII، Dde) اشاره کرد. مطالعات نشان داده‌اند که آنزیم Msp I توانایی بالایی جهت افتراق گونه‌های *Candida* دارد و برش قطعات تکثیر شده‌ی ITS با Msp I الگوی اختصاصی برای هر گونه را به وجود می‌آورد (۱۹). این آنزیم، برای *Candida albicans*، *Candida tropicalis*، *Candida kefir*، *Candida glabrata* و *Candida lusitaniae* ۲ باند اما با اندازه‌های متفاوت و برای *Candida guilliermondii* ۳ باند ایجاد می‌کند. در *Candida parapsilosis* و *Candida kefir* اندازه‌ی محصول PCR و RFLP یکسان است؛ به طوری که این اندازه‌ی باند به ترتیب ۵۲۰ و ۷۲۱ جفت باز برای *Candida parapsilosis* و *Candida kefir* می‌باشد (۲۰).

در این مطالعه، فراوانی گونه‌های جدا شده به ترتیب شامل

Candida tropicalis را گونه‌هایی با کمترین فراوانی مشخص کردند. اختلاف در تعداد و تنوع فراوانی گونه‌های جدا شده به عواملی مانند تفاوت در ناحیه‌ی آناتومیک تهیه‌ی نمونه، تفاوت در بیماری‌های زمینه‌ای در بیماران، سن، جنس بیماران و همچنین تفاوت در تعداد بیماران مورد بررسی و روش‌های مورد استفاده جهت تشخیص و مهارت و تجربه‌ی افراد هنگام به کارگیری این روش‌ها بستگی دارد. در این مطالعه، بیشترین موارد ابتلا به *Candidiasis*، در گروه سنی نوزادی تا ۱۰ سال و بعد از آن در گروه سنی ۸۰-۷۱ سال و کمترین موارد در گروه سنی ۷۰-۶۱ سال و سپس ۲۰-۱۱ سال مشاهده شد.

در مطالعه‌ی محمدی و همکاران، گروه سنی ۸۰-۷۱ سال کمترین و گروه سنی ۵۰-۲۰ سال بیشترین موارد ابتلا به *Candidiasis* را داشتند (۲۱). همچنین در یک مطالعه‌ی دیگر، بیشترین فراوانی موارد ابتلا در گروه سنی ۳۰-۲۱ سال و کمترین فراوانی در گروه سنی ۸۰-۷۱ سال به دست آمد (۱۰). محدوده‌ی سنی در مطالعه‌ی حاضر با مطالعات ذکر شده از نظر بیشترین و کمترین موارد ابتلا به *Candidiasis* متفاوت بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد خانم تکتم بخشی به شماره‌ی ۹۲/۷۸ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان است که در معاونت تحقیقات و فن‌آوری این دانشگاه، تصویب و با همکاری و مساعدت این معاونت انجام شد. نویسندگان مقاله از حمایت‌های ایشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

بهترین افتراق دهنده‌ی *Candida albicans* از سایر گونه‌های *Candida* می‌باشد و آنزیم Bfal به خوبی می‌تواند انواع غیر از *Candida albicans* را افتراق دهد و آنزیم Ddel برای تأیید گونه‌های *Candida albicans* مناسب است (۲۲).

مشابه مطالعه‌ی حاضر، در اکثر مطالعات انجام شده، گونه‌ی غالب شناسایی شده *Candida albicans* است. اگر چه فراوانی آن در مطالعات مختلف، متفاوت می‌باشد. در این مطالعه، دومین گونه‌ی شایع *Candida* یا اولین گونه‌ی شایع غیر *Candida albicans*، *Candida glabrata* بود. در بررسی شکوهی و همکاران (۱۳)، دیبا و همکاران (۲۳) و مولایی و همکاران (۲۴) هم به طور مشابه دومین گونه‌ی *Candida* پس از *Candida albicans*، *Candida glabrata* بود. در مطالعه‌ی سلیمانی و همکاران (۱۹) دومین گونه‌ی شایع *Candida parapsilosis*، *Candida* بود.

از نظر دومین گونه‌ی شایع غیر *Candida albicans*، نتایج این مطالعه با مطالعه‌ی فهمی و همکاران (۲۵) که *Candida tropicalis* را معرفی می‌کند، مشابه است. همچنین در این بررسی، گونه‌های کمتر شایع *Candida guilliermondii* و *Candida kefir* بودند؛ در حالی که فولادی و همکاران (۱۷) و رودباری و همکاران (۲۶) *Candida parapsilosis*، فهمی و همکاران (۲۵) گونه‌های *Candida guilliermondii* و *Candida lusitanae*، فلاحی و همکاران (۲۷) گونه‌های *Candida famata* و *Candida krusei* و (۲۷)، فراست و همکاران (۲۸) گونه‌های *Candida Pulcherrima* و *Candida lusitanae* و سهرابی و همکاران (۱۴) گونه‌ی

References

1. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20(1): 115-25.
2. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9(7): 327-35.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133-63.
4. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical mycology*. 1st ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 2002. p. 195-239.
5. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis ME, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50(1): 25-32.
6. Kofla G, Ruhnke M. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression. *J Microbiol Methods* 2007; 68(1): 178-83.
7. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(8): 1027-32.
8. Allam AA, Salem IM. Evaluation of rapid molecular identification of clinically important *Candida* Spp isolated from immuno-compromised patients using RF-PCR. *Journal of American Science* 2012; 8(2): 463-8.
9. Fatahi M, Shokohi T, Hashemi Sooteh TMB, Hedayati MT, Okhovatian A, Tamadoni A, et al. Molecular identification of *Candida albicans* isolated from the oncology patients at four university hospitals in Mazandaran province (2005-6). *J Mazandaran Univ Med Sci* 2007; 1761(1): 11. [In Persian].
10. Mohammadi R, Mirhendi H, Yadegari MH, Shadzi Sh, Jalalizand N. Identification and frequency of *Candida* species in patients with different forms of candidiasis in Isfahan, using PCR-RFLP method. *J Isfahan Med Sch* 2011; 29(133): 336-43. [In Persian].
11. Ayatollahi Mousavi SA, Salari S, Rezaie S, Shahabi Nejad N, Hadizadeh S, Kamyabi H, et al. Identification of *Candida* species isolated from oral colonization in

- Iranian HIV-positive patients, by PCR-RFLP method. *Jundishapur J Microbiol* 2012; 5(1): 336-40.
12. Salari S, Khosravi AR, Katirae F, Katirae F, Ayatollahi Mousavi SA, Shokri H, et al. Evaluation of inhibitory effects of cuminum cyminum oil on the fluconazole resistant and susceptible *Candida albicans* isolated from HIV patients in Iran. *J Am Sci* 2012; 8(5): 54-60.
 13. Shokohi T, Hashemi Sotah MB, Saltanat PZ, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian J Med Microbiol* 2010; 28(2): 147-51.
 14. Sohrabi H, Sarookhani MR, Ezani A. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by comparison of new molecular and culture methods in 2013. *J Arak Univ Med Sci* 2013; 16(8): 46-54. [In Persian].
 15. Skandari A, Mesbah Namin A, Yadeghari M. Identification of important pathogenic yeast *Candida* species in acute candidiasis using PCR. *Trauma Mon* 2008; 13(02 SP 115-123).
 16. Ghahri M, Mirhendi SH, Yadegari MH, Hajizadeh E, Shidfar MR. Identification of pathogenic yeasts isolated from onychomycosis in Tehran, using polymerase chain reaction and enzymatic digestion. *Modares J Med Sci Pathol* 2010; 13(1): 79-91. [In Persian].
 17. Fouladi B, Yadegari MH, Rajabibazl M, Fazaeli A, Hashemzadeh Chaleshtori M. Identification of *Candida* species in patients with vulvovaginitis presenting different clinical symptoms. *J Zanjan Univ Med Sci* 2015; 23(98): 53-67. [In Persian].
 18. Alinejad M, Nasrollahi OA, Hashemi S. Drug resistance of *Candida* species isolated from fungal peritonitis by PCR-RFLP method. *J Babol Univ Med Sci* 2012; 14(64): 53-62. [In Persian].
 19. Solimani P, Salari S, Khalizadeh S, Hassanzad M, Khodavaisy S, Abastabar M, et al. Use of PCR-RFLP and PCR-HWP1 for identification of *Candida* species isolated from cystic fibrosis patients. *Res Mol Med* 2014; 2(3): 24-8.
 20. Ayatollahi Mousavi SA, Khalesi E, Shahidi Bonjar GH, Aghighi S, Sharifi SF, Aram F. Rapid molecular diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Biotechnology* 2007; 6(4): 583-7.
 21. Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol* 2013; 51(6): 657-63.
 22. EL-Mashad N, Raafat D, Elewa A, Othman W. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for characterization of *Candida* species causing onychomycosis. *J Adv Med* 2012; 1(2): 77-84.
 23. Diba K, Namaki A, Ayatollahi H, Hanifian H. Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis and recurring vulvovaginal candidiasis. *Iran J Med Microbiol* 2014; 9(3): 45-50.
 24. Molaei H, Mirhendi SH, Brandao J, Mirdashti R, Rosado L. Comparison of enzymatic method rapid yeast plus system with RFLP-PCR for identification of isolated yeast from vulvovaginal candidiasis. *Iran J Basic Med Sci* 2011; 14(5): 443-50.
 25. Fahami S, Kordbacheh P, Moazeni M, Mahmoodi M, Mirhendi H. Species identification and strain typing of *Candida* isolates by PCR-RFLP and RAPD-PCR analysis for determining the probable sources of nosocomial infections. *Iran Red Crescent Med J* 2010; 12(5): 539-47.
 26. Roudbary M, Roudbarmohammadi Sh, Bakhshi B, Farhadi Z, Nikoomanesh F. Identification of *Candida* species isolated from Iranian women with vaginal candidiasis by PCR-RFLP method. *Eur J Exp Biol* 2013; 3(6): 365-9.
 27. Fallahi AA, Korbacheh P, Zaini F, Mirhendi H, Zeraati H, Noorbakhsh F, et al. *Candida* species in cutaneous candidiasis patients in the Guilan province in Iran; identified by PCR-RFLP method. *Acta Med Iran* 2013; 51(11): 799-804.
 28. Farasat A, Ghahri M, Mirhendi H, Beiraghi S. Morphological and molecular characteristics of *Candida pulcherrima*, an opportunistic yeast, isolated from nail lesions in Iran. *Adv Stud Biol* 2012; 4(6): 297-306.

Molecular Identification of Candida Species in Patients with Candidiasis in Birjand, Iran, Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay

Toktam Bakhshi MSc¹, Samira Salari PhD², Ali Naseri PhD³, Iraj Esfandiarpour MD⁴,
Mohammad Ali Mohammadi MSc⁵, Pooya Ghasemi Nejad Almani PhD⁶

Original Article

Abstract

Background: In recent years, the incidence of opportunistic fungal infections such as candidiasis, especially in immunocompromised patients, has considerably increased. Rapid and accurate identification of candida isolates is necessary for effective antifungal therapy and hospital infections management. In this study, polymerase chain reaction (PCR)-based technique using a one-enzyme restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used for discrimination of candida species.

Methods: 98 yeast strains were obtained from 90 patients with candidiasis during one-year period, from December 2013 to December 2014, in Birjand city, Iran. Clinical samples were cultured on Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol at 32°C and CHROMagar™ at 35°C for 48 hours to produce species-specific colors. In next stage, identification of Candida species was performed using PCR-RFLP method with the MspI restriction enzyme.

Findings: Totally, 98 candida isolates successfully were isolated from different clinical samples and identified via PCR-RFLP method using MspI. The age group of infancy to 10-year-old had the highest prevalence of candidiasis. In clinical samples, most of the Candida isolates were isolated from urine (83.86%). The most commonly identified species were Candida albicans in 41 cases (41.84%), Candida glabrata in 16 case (16.32%), Candida tropicalis in 12 cases (12.24%), Candida krusei in 10 cases (10.2%), Candida parapsilosis in 8 cases (8.08%), Candida Lusitania in 7 cases (7.14%), and Candida kefyr and Candida guilliermondii each one in 2 cases (2.04%).

Conclusion: PCR-RFLP assay with restriction enzyme MspI is an easy, rapid, and reliable method for identification of Candida species.

Keywords: Candida species, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), MspI

Citation: Bakhshi T, Salari S, Naseri A, Esfandiarpour I, Mohammadi MA, Ghasemi Nejad Almani P. **Molecular Identification of Candida Species in Patients with Candidiasis in Birjand, Iran, Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) Assay.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(359): 1986-93

1- MSc Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2- Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3- Assistant Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- Professor, Department of Dermatology, Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

5- Instructor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

6- PhD Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Corresponding Author: Samira Salari PhD, Email: sa_salari@kmu.ac.ir

ارزیابی نقش تصویربرداری Diffusion tensor در درجه‌بندی تومورهای گلیال بر اساس آنیزوتروپی نسبی

فریبا دوانیان^۱، دکتر فریبرز فائق^۲، دکتر سهراب شهزادی^۳، زهرا فرشیدفر^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: شایع‌ترین تومور مغزی، تومورهای گلیوما هستند. روش اصلی و استاندارد طلایی برای مشخص کردن درجه‌ی تومورهای گلیوما، نمونه‌برداری است که روشی تهاجمی محسوب می‌شود. ارزیابی صحیح درجه‌ی تومور برای تعیین بهترین و مناسب‌ترین روش درمان، بسیار حیاتی است. هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش تصویربرداری Diffusion tensor (DTI یا Diffusion tensor imaging) به عنوان یک روش غیر تهاجمی بر اساس آنیزوتروپی نسبی (Relative anisotropy یا RA) در درجه‌بندی تومورهای گلیوما است.

روش‌ها: در این مطالعه، ۲۰ بیمار مبتلا به تومور گلیوما با استفاده از مگنت ۱/۵ تسلا تحت تصویربرداری قرار گرفتند. دو Region of interest (ROI) یکی ماده‌ی سفید مجاور تومور و دیگری، الیاف عصبی مشابه با ROI اول در نیمکره‌ی مقابل تعریف شد.

یافته‌ها: مقدار و نسبت آنیزوتروپی نسبی در تومورهای درجه‌ی پایین، بالاتر از تومورهای درجه‌ی بالا بود ($PRA_t = 0/008$ و $PRA_n = 0/039$).

نتیجه‌گیری: بنا بر یافته‌های ما، از پارامتر آنیزوتروپی نسبی می‌توان در درجه‌بندی تومور کمک گرفت.

واژگان کلیدی: تصویربرداری Diffusion tensor، درجه‌بندی تومورها، تومور گلیوما، آنیزوتروپی نسبی

ارجاع: دوانیان فریبا، فائق فریبرز، شهزادی سهراب، فرشیدفر زهرا. ارزیابی نقش تصویربرداری Diffusion tensor در درجه‌بندی تومورهای گلیال

بر اساس آنیزوتروپی نسبی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۹۴-۱۹۹۸

مقدمه

تومورهای گلیوما، شایع‌ترین تومورها در سیستم اعصاب مرکزی هستند. این تومورها، از سلول‌های گلیال منشأ می‌گیرند و به همین دلیل آن‌ها را گلیوما می‌نامند. این تومورها باعث جابه‌جایی، اختلال و یا نفوذ به الیاف عصبی مجاور می‌شوند. تومورهای گلیوما بر اساس تقسیم‌بندی سازمان جهانی بهداشت (World Health Organisation یا WHO) به دو گروه درجه‌ی بالا (High grade) و پایین (Low grade) تقسیم می‌شوند. با وجود پیشرفت‌ها در رادیوتراپی و شیمی‌درمانی، پیش‌بینی و بهبود در تومورهای درجه‌ی بالا کماکان ضعیف است؛ در حالی که در تومورهای درجه‌ی پایین تا حدودی خوب است (۱).

روش استاندارد طلایی برای مشخص کردن درجه‌ی تومورهای گلیوما، بیوپسی است که یک روش تهاجمی و پرخطر محسوب می‌شود.

محدودیت مقدار و مکان نمونه‌برداری از دیگر معایب بیوپسی است. ارزیابی صحیح درجه‌ی تومور، برای تعیین روش درمان مناسب بسیار مهم است (۲-۳).

MRI (Magnetic resonance imaging) ممکن است وسعت تومور را کمتر از حد واقعی تخمین بزند و همچنین، روش معتبری جهت درجه بندی و در نتیجه انتخاب روش درمان مناسب محسوب نمی‌شود (۴-۵). از آن جایی که نمونه برداری به عنوان روش استاندارد طلایی، روشی تهاجمی است، این مطالعه با هدف ارزیابی نقش تصویربرداری Diffusion tensor imaging (DTI) به عنوان یک روش غیر تهاجمی در تشخیص درجه‌ی تومور گلیوما، بر اساس آنیزوتروپی نسبی (RA یا Relative anisotropy) انجام شد.

۱- کارشناس ارشد، گروه تکنولوژی رادیولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه تکنولوژی رادیولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات جراحی مغز و اعصاب عملکردی، بیمارستان شهدای تجریش، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد، گروه تکنولوژی رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

$$RA = \sqrt{\frac{1}{2} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2}}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

این صورت بود: برای هر بیمار دو Region of interest (ROI) برای به دست آوردن RA تعیین می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، ROI اول روی ماده‌ی سفید مجاور تومور و ROI دوم روی لیاف مشابه در نیمکره‌ی سالم قرار گرفت. مقادیر RA برای هر دو ROI به دست آمد. سپس، مقدار RA مجاور تومور بر مقدار آن در نیمکره‌ی سالم تقسیم گردید تا نسبت RA به دست آید.

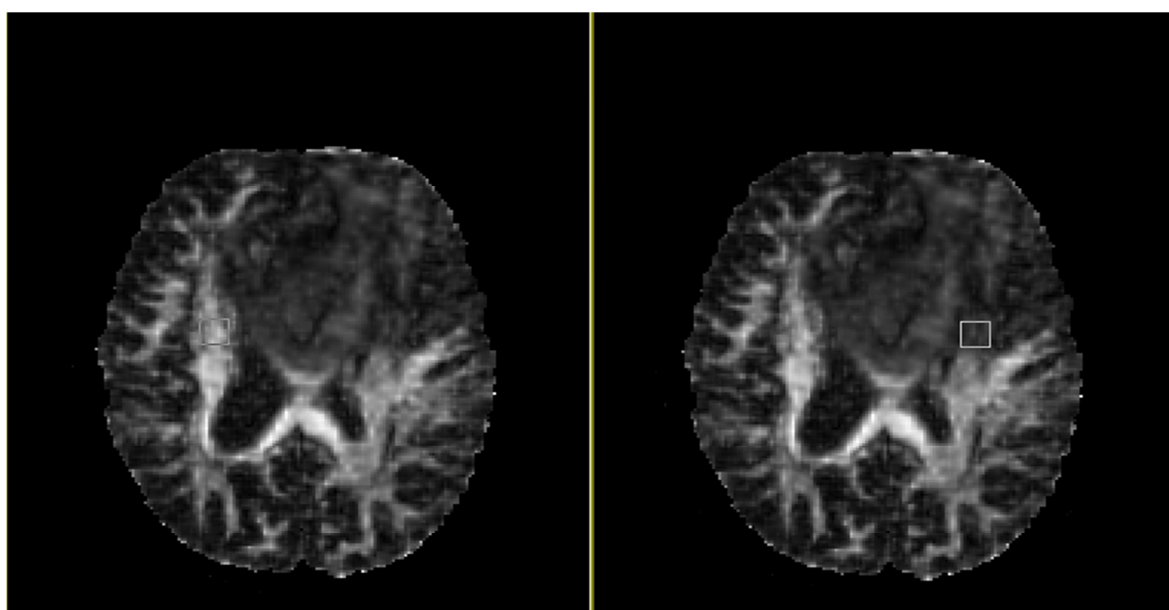
در این مطالعه، از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) برای واکاوی داده‌ها استفاده شد. همچنین، منحنی Receiver operating characteristic (ROC) رسم شد و از سطح زیر منحنی (AUC یا Area under curve) برای ارزیابی رابطه‌ی بین RA و درجه‌ی تومور گلیوما استفاده گردید. از آزمون t جهت بررسی مقایسه‌ای داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

مقدار و نسبت RA اندازه‌گیری شده در تومورهای درجه‌ی بالا و پایین گلیوما در جدول ۱ آمده است. از آزمون t جهت ارزیابی ارتباط بین مقدار و نسبت RA و درجه‌ی تومور استفاده شد. در هر دو مورد، اختلاف معنی‌داری بین تومورهای درجه‌ی بالا و پایین مشاهده شد ($P = 0/0080$ برای RA_t و $P = 0/0390$ برای $RA_{t/n}$). سپس، برای بررسی بیشتر و به دست آوردن آستانه‌ی بین تومورهای درجه‌ی بالا و پایین، از منحنی ROC استفاده شد.

روش‌ها

۲۰ بیمار مبتلا به تومور (با میانگین سنی $13/65 \pm 45/90$ سال) که بر اساس نمونه‌برداری نوع و درجه‌ی تومور آنان تعیین شده بود، مورد تصویربرداری قرار گرفتند. با توجه به دسته‌بندی سازمان جهانی بهداشت، در این مطالعه ۱۳ بیمار درجه‌ی پایین و ۷ بیمار درجه‌ی بالا شرکت داشتند. در کل، ۹ بیمار زن (با میانگین سن $15/90 \pm 48/30$ و محدوده‌ی سنی ۶۸-۱۵ سال) و ۱۱ بیمار مرد (با میانگین سن $11/89 \pm 43/90$ و محدوده‌ی سنی ۶۹-۲۶ سال) حضور داشتند. تصویربرداری با استفاده از دستگاه Siemens (AVANTO, Siemens, Germany) ۱/۵ تسلا انجام گرفت. پس از قرار دادن بیمار به صورت تا‌ق‌باز (Supine) بر روی تخت و بستن کویل هشت کاناله‌ی مخصوص تصویربرداری سکانس DTI، تصویربرداری Multi-directional diffusion، مطابق با پارامترهای TR/TE برابر $8600/107$ ms، Non-linear gradient directions مساوی ۱۲، Number of excitation برابر ۱، با دو مقدار b-value مساوی 0 و 1000 s/mm^۲ و تصویر ساختاری (Structural) مطابق با پارامترهای TR/TE برابر $1650/3$ ms، با ماتریس یکپوخت با Slice thickness مساوی ۱ mm و میدان دید 144×256 تهیه شد. داده‌های خام از دستگاه گرفته شد و با نرم‌افزارهای مخصوص پردازش تصاویر DTI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۲۰ سری داده‌ی Diffusion به همراه تصویر b_0 با استفاده از نرم‌افزار ExplorDTI پیش‌پردازش شدند. پردازش نهایی توسط نرم‌افزار DTIStudio صورت گرفت. فرمول به دست آوردن RA به



شکل ۱. تومور درجه‌ی بالای گلیوما در بیمار مرد ۴۸ ساله، محل قرارگیری ROI Region of interest در تصویر نمایش داده شده است.

جدول ۱. میانگین مقادیر و نسبت آنیزوتروپی نسبی در تومور درجه‌ی بالا و پایین گلیوما

Peritumoral (RA _t)	نسبت (RA _{t/n})	آنیزوتروپی نسبی (RA (ROI) Region of interest) درجه‌ی تومور
۰/۳۰ ± ۰/۱۵	۰/۴۲ ± ۰/۱۷	بالا
۰/۳۰ ± ۰/۰۹	۰/۲۴ ± ۰/۱۶	پایین

RA: Relative anisotropy

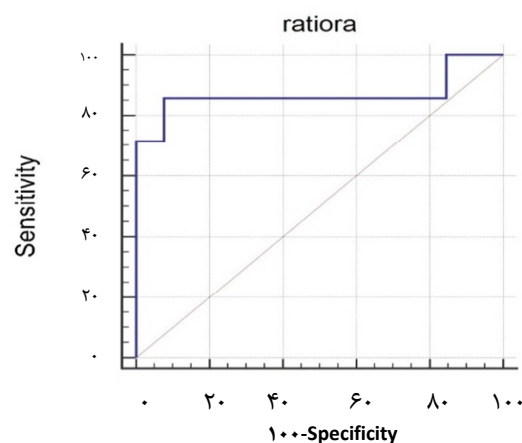
آنیزوتروپیک مولکول‌های آب درون ماده‌ی سفید، به طور اساسی مربوط به سازمان‌دهی خاص دسته‌های فیبرهای عصبی است و یکپارچگی الیاف عصبی را نشان می‌دهد. با این وجود، عملکرد انتشار ناهمسان‌گرد (آنیزوتروپیک) مولکول‌های آب درون ماده‌ی سفید به طور کامل مشخص نشده است. غشای آکسون الیاف عصبی، نقش اصلی در انتشار ناهمسان آب، بازی می‌کند؛ اگر چه میلی‌نیشن باعث افزایش ناهمسانی انتشار مولکول‌های آب می‌شود (۶، ۳). بر این اساس، مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که الیاف عصبی مجاور تومورهای درجه‌ی پایین، بیش از الیاف مجاور تومورهای درجه‌ی بالا یکپارچگی خود را حفظ کرده‌اند و در نتیجه، میزان ناهمسانی انتشار مولکول‌های آب بیشتر است. در این مطالعه، ROI بر الیاف عصبی حاشیه‌ی تومور قرار داده شد.

نسبت قسمت ناهمسان (آنیزوتروپیک) Tensor بر بخش همسان (ایزوتروپیک) آن است (۷). Papageorgiou و همکاران نیز میزان RA را در حاشیه‌ی تومور پایین‌تر الیاف عصبی مشابه در نیمکره‌ی سالم به دست آوردند. همچنین، مقدار آن را در تومورهای درجه‌ی پایین بیشتر از تومورهای درجه‌ی بالا درآوردند (۸). مطالعات دیگری که بر آنیزوتروپی انجام شده است، مقدار آنیزوتروپی اطراف تومور را پایین‌تر از الیاف مشابه در نیمکره‌ی سالم برآورد کردند؛ همچنین، مقدار آنیزوتروپی مجاور تومورهای درجه‌ی پایین، بالاتر از تومورهای درجه‌ی بالا گزارش شده است (۹-۱۱).

در مطالعات گذشته، ROI بیشتر بر روی تصاویر خاکستری (Gray scale) مانند T1 و T2 ترسیم شده است، در صورتی که این تصاویر، به صورت مستقیم نمی‌توانند ارتباط آناتومیک بین بافت تومور و الیاف عصبی اطراف تومور را مشخص کنند.

در این مطالعه، از نقشه‌ی فرکشنال آنیزوتروپی برای ترسیم ROI استفاده گردید. از آن جایی که بین الیاف عصبی مختلف تغییرات طبیعی (Normal variation) وجود دارد، نمی‌توان مقادیر حاصل از الیاف متفاوت را با هم مقایسه کرد. مقالات و کتاب‌های مختلف این امر را با این مثال شرح می‌دهند: «سیب را می‌توان با سیب مقایسه کرد و نه با پرتقال» (Apples to apples, not apples to oranges). به بیان دیگر، اگر برای مثال میزان آنیزوتروپی در الیاف عصبی X بالاتر

میزان سطح زیر منحنی ROC، قدرت تشخیص آزمون را بیان می‌کند؛ هر چه سطح زیر منحنی به عدد ۱ نزدیک‌تر شود، بیان‌گر این است که آزمون ارزش تشخیصی بالاتری دارد. این مساحت، عبارت از این احتمال است که هر گاه متغیر آزمون به صورت تصادفی برای دو فرد با تومورهای درجه‌ی پایین و درجه‌ی بالا اندازه‌گیری شود، مقادیر منتج به ترتیب صحیح باشد؛ یعنی به عنوان مثال، برای فرد دارای تومور درجه‌ی پایین بالاتر از فرد دارای تومور درجه‌ی بالا (و یا برعکس) باشد. هر چه قدرت آزمون بیشتر باشد، منحنی ROC بالای قطر مربع و به حالت ایده‌آل (مساحت یک) نزدیک خواهد بود. در این مطالعه، سطح زیر منحنی برابر ۰/۸۶۸ و نزدیک به ۱ بود که قدرت تشخیصی بالای آزمون را نشان داد. $P = ۰/۰۰۲۴$ نیز بیان‌گر معنی‌داری نتایج آزمون بود و میزان آستانه (Associated criterion) در این آزمون ۰/۲۸ تعیین شد؛ یعنی مقادیر بالاتر از این عدد درجه‌ی پایین و پایین‌تر از آن درجه‌ی بالای تومور محسوب می‌شدند. در این آزمون، حساسیت ۸۵/۷۱ درصد و ویژگی ۹۲/۳۱ درصد بود. منحنی حاصل در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. منحنی ROC (Receiver operating characteristic)

بحث

در این مطالعه، میزان و نسبت RA مجاور تومورهای درجه‌ی پایین، بیشتر از تومورهای درجه‌ی بالا برآورد شد. انتشار ناهمسان یا

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان نامه دانشجویی است. بدین وسیله از تمامی کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند، سپاسگزاری می گردد.

از الیاف عصبی Y باشد، نمی توان استنتاج کرد که میزان میلینیشن آن بیشتر است (۱۲). به همین جهت، در این مطالعه از «نسبت» RA استفاده شد تا اثر مواردی از این قبیل از بین برود.

References

1. Brat DJ, van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* 2004; 84(4): 397-405.
2. Kayama T, Kumabe T, Tominaga T, Yoshimoto T. Prognostic value of complete response after the initial treatment for malignant astrocytoma. *Neurol Res* 1996; 18(4): 321-4.
3. Lee HY, Na DG, Song IC, Lee DH, Seo HS, Kim JH, et al. Diffusion-tensor imaging for glioma grading at 3-T magnetic resonance imaging: analysis of fractional anisotropy and mean diffusivity. *J Comput Assist Tomogr* 2008; 32(2): 298-303.
4. Johnson PC, Hunt SJ, Drayer BP. Human cerebral gliomas: correlation of postmortem MR imaging and neuropathologic findings. *Radiology* 1989; 170(1 Pt 1): 211-7.
5. Watanabe M, Tanaka R, Takeda N. Magnetic resonance imaging and histopathology of cerebral gliomas. *Neuroradiology* 1992; 34(6): 463-9.
6. Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system- a technical review. *NMR Biomed* 2002; 15(7-8): 435-55.
7. Exarchos TP, Papadopoulos A, Fotiadis DI. *Handbook of Research on Advanced Techniques in Diagnostic Imaging and Biomedical Applications*. Hershey, PA: Medical Information Science Reference; 2009.
8. Papageorgiou TS, Chourmouzi D, Drevelengas A, Kouskouras K, Siountas A. Diffusion Tensor Imaging in brain tumors: A study on gliomas and metastases. *Phys Med* 2015; 31(7): 767-73.
9. Smitha KA, Gupta AK, Jayasree RS. Total magnitude of diffusion tensor imaging as an effective tool for the differentiation of glioma. *Eur J Radiol* 2013; 82(5): 857-61.
10. Stadlbauer A, Nimsky C, Buslei R, Salomonowitz E, Hammen T, Buchfelder M, et al. Diffusion tensor imaging and optimized fiber tracking in glioma patients: Histopathologic evaluation of tumor-invaded white matter structures. *Neuroimage* 2007; 34(3): 949-56.
11. Goebell E, Paustenbach S, Vaeterlein O, Ding XQ, Heese O, Fiehler J, et al. Low-grade and anaplastic gliomas: differences in architecture evaluated with diffusion-tensor MR imaging. *Radiology* 2006; 239(1): 217-22.
12. Seunarine KK, Alexander DC. Multiple fibers: Beyond the Diffusion tensor. In: Johansen-Berg H, Behrens TEJ, editors. *Diffusion MRI*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 2014. p. 105-23.

Evaluation of the Role of Diffusion Tensor Imaging in Grading of Glial Tumors based on Relative Anisotropy

Fariba Davnian MSc¹, Fariborz Faeghi PhD², Sohrab Shahzadi MD³, Zahra Shidfar MSc⁴

Original Article

Abstract

Background: The most common primary tumors of the brain are gliomas. Despite improvements in treatment strategy, the prognosis for patients with high-grade gliomas has stayed poor, while it is relatively good for low-grade gliomas. The main and gold standard way for grading glial tumor is biopsy. Accurate assessment of tumor grade is vital for the determination of best treatment plan. The purpose of this study was to evaluate the role of diffusion tensor imaging (as a noninvasive method) using relative anisotropy (RA) in glial tumor grading.

Methods: A total of 20 histologically confirmed gliomas patients were scanned using a 1.5-Tesla magnetic resonance scanner. We described two regions of interest (ROIs), white matter adjacent to the tumor and the homologous fiber tracts to first ROI in the contralateral hemisphere.

Findings: The relative anisotropy values and ratio of the low-grade gliomas tended to be higher than those of the high-grade gliomas in the peritumoral fibers ($P = 0.008$, for RA_t and $P = 0.039$ for $RA_{t/n}$).

Conclusion: Our findings prove that the relative anisotropy was different between low- and high-grade gliomas, which may be helpful in grading.

Keywords: Diffusion tensor imaging, Tumor grading, Glioma tumor, Relative anisotropy

Citation: Davnian F, Faeghi F, Shahzadi S, Shidfar Z. Evaluation of the Role of Diffusion Tensor Imaging in Grading of Glial Tumors based on Relative Anisotropy. J Isfahan Med Sch 2016; 33(359): 1994-8

1- Department of Radiology, School of Paramedicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Radiology, School of Paramedicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Professor, Research Center for Neurosurgery and Functional Nerves, Shohadaye Tajrish Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Radiology, School of Paramedicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Corresponding Author: Fariborz Faeghi PhD, Email: f_faeghi@sbmu.ac.ir

عوارض کودکان مبتلا به سندرم نفروتیک بستری شده در بیمارستان کودکان امام حسین (ع) اصفهان

زهرا جوشقانی^۱، دکتر آلاله قیصری^۲، مجتبی کیخا^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مطالعات جهانی نشان می‌دهد که در هر سال، ۷-۲ مورد جدید از سندرم نفروتیک اولیه در هر ۱۰۰۰۰۰ کودک زیر ۱۶ سال به وقوع می‌پیوندد و شیوع جمعی آن، ۷/۱۵ در هر ۱۰۰۰۰۰ کودک می‌باشد. همچنین، سندرم نفروتیک با دفع زیاد پروتئین ادرار، کاهش پروتئین خون و افزایش چربی‌های خون مشخص می‌گردد.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر بود که با هدف تعیین بروز عوارض مربوط به سندرم نفروتیک در کودکان انجام شد. کلیه‌ی بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک که در سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ در مرکز آموزشی-درمانی کودکان امام حسین (ع) اصفهان بستری شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. اطلاعات شامل سن (سال)، جنس، فشار خون سیستول و دیاستول (mmHg)، مدت بستری (روز)، تعداد عود، میزان آلبومین (g/dl)، کراتینین (g/dl)، کلسترول (mg/dl)، تری‌گلیسرید (mg/dl) و پروتئین ادرار (mg/24 hours) و همچنین میزان تصفیه‌ی گلومرولی (Glomerular filtration rate یا GFR) (mg/minute)، از پرونده‌ی مربوط به آخرین بستری آنان استخراج شد.

یافته‌ها: میانگین سن بیماران $8/21 \pm 3/80$ سال بود. بیشترین فراوانی سن بیماران، ۵ سال بود. ۳۹/۳ درصد از بیماران، پرفشاری خون سیستول و ۳۶/۴ درصد، پرفشاری خون دیاستول داشتند. همچنین، در ۹۰/۳ درصد از بیماران، اختلال افزایش چربی‌های خون (افزایش تری‌گلیسرید یا کلسترول) مشاهده شد. ضمن این که، به ترتیب ۴۱/۹ و ۸۸/۴ درصد از بیماران، اختلال در آلبومین و GFR داشتند. درجه‌ی پروتئین‌آوری در ۵۸/۰ درصد از بیماران، +++ و در ۲۰/۲ درصد آنان، ++++ بود.

نتیجه‌گیری: از آن جایی که سیر درمانی و بهبودی این بیماران بسیار کند و وابسته به زمان است و بهبودی کامل نیز وجود ندارد، لازم است با شناخت عوارض این بیماری، به درمان علامتی و جلوگیری از پیشرفت عوامل خطر اقدام نمود تا بیماری‌ها و مشکلات ثانویه به وجود نیاید.

واژگان کلیدی: سندرم نفروتیک، عوارض، کودکان

ارجاع: جوشقانی زهرا، قیصری آلاله، کیخا مجتبی. عوارض کودکان مبتلا به سندرم نفروتیک بستری شده در بیمارستان کودکان امام حسین (ع)

اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۲۰۰۳-۱۹۹۹

مقدمه

سندرم نفروتیک اولیه که شایع‌ترین بیماری مزمن کلیه در دوران کودکی می‌باشد، ۹۰ درصد از موارد نفروز در کودکان را تشکیل می‌دهد (۱). مطالعات جهانی نشان می‌دهد که در هر سال، ۷-۲ مورد جدید از سندرم نفروتیک اولیه در هر ۱۰۰۰۰۰ کودک زیر ۱۶ سال به وقوع می‌پیوندد و شیوع جمعی آن ۷/۱۵ در هر ۱۰۰۰۰۰ کودک می‌باشد. بیماران، اغلب به دلیل ادم یا عفونت باکتریال به پزشک مراجعه می‌کنند (۲). اکثر کودکان درمان شده با دوره‌های کوتاه مدت پردونیزولون خوراکی، بعد از چند دوره عود، بهبود می‌یابند (۳). همچنین، سندرم نفروتیک با دفع زیاد پروتئین ادرار، کاهش

پروتئین خون و افزایش چربی‌های خون مشخص می‌گردد و در ۹۰ درصد کودکان مبتلا، دلیلی برای آن پیدا نمی‌شود (ایدیوپاتیک) و در ۱۰ درصد موارد، سندرم نفروتیک ثانویه به بیماری‌های گلومرولی ایجاد می‌شود (۴).

از موارد تشخیصی این بیماری، علاوه بر پروتئین‌آوری شدید، آلبومین سرم کمتر از $2/5$ g و کلسترول بالای 250 mg می‌باشد (۵). کودکان مبتلا به سندرم نفروتیک بیشتر از کودکان سالم، مستعد ابتلا به عفونت‌های باکتریال هستند (۶). علت این امر، کاهش سطح ایمونوگلوبولین G، اشکال در فعال شدن کمپلمان در سیستم جایگزین، نقص در اپسونیزاسیون باکتری‌های کپسول‌دار، کم‌کاری طحال (۴).

۱- پرستار، مرکز آموزشی-درمانی کودکان امام حسین (ع)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۳- اپیدمیولوژیست، مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان، پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: mr.mojtabakeikha@gmail.com

نویسنده‌ی مسؤؤل: مجتبی کیخا

آزمون‌های χ^2 و t به تحلیل داده‌ها پرداخته شد. همچنین، توصیف داده‌ها با استفاده از جداول و نمودارها و شاخص‌های مرکزی و پراکندگی انجام شد. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از استخراج اطلاعات از پرونده‌های بیماران، ۱۴۱ بیمار مبتلا به سندرم نفروتیک وارد مطالعه شدند. از این میان، ۹۴ نفر مذکر و ۴۶ نفر مؤنث بودند. میانگین سن بیماران $۸/۲۱ \pm ۳/۸۰$ سال بود. بیشترین فراوانی مربوط به سن ۵ سال بود. اطلاعات دموگرافیک و یافته‌های بالینی بیماران به طور کامل در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیک و یافته‌های بالینی بیماران مورد مطالعه

متغیر	میانگین \pm انحراف معیار
سن (سال)	$۸/۲۱ \pm ۳/۸۰$
فشار خون سیستول (mmHg)	$۱۰۴/۶۵ \pm ۱۶/۷۰$
فشار خون دیاستول (mmHg)	$۶۷/۹۹ \pm ۱۰/۸۶$
آلبومین (g/dl)	$۲/۴۶ \pm ۰/۷۴$
کراتینین (g/dl)	$۰/۵۷ \pm ۰/۳۶$
کلسترول (mg/dl)	$۳۸۶/۰۱ \pm ۱۴۲/۵۰$
تری‌گلیسرید (mg/dl)	$۳۷۶/۱۵ \pm ۴۸۶/۳۱$
مدت زمان بستری (روز)	$۴/۹۰ \pm ۴/۱۱$

با استفاده از آزمون t به بررسی اختلاف بین متغیرهای جدول ۱ دو جنس مذکر و مؤنث پرداخته شد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سن و سایر یافته‌های آزمایشگاهی بین دو جنس مذکر و مؤنث وجود ندارد.

مشکلات و عوارض مربوط به بیماران در جدول ۲ آمده است. مشاهده می‌شود که نزدیک به ۴۰ درصد از بیماران پرفشاری خون سیستول و ۳۷ درصد از بیماران پرفشاری خون دیاستول داشتند.

همچنین، ۹۰ درصد از بیماران دارای اختلال افزایش چربی‌های خون (افزایش تری‌گلیسرید یا کلسترول) بودند. ضمن این که، به ترتیب ۴۱/۹ و ۸۸/۴ درصد از بیماران دارای اختلال در آلبومین و میزان تصفیه‌ی گلوبومرولی بودند.

میزان پروتئین ادرار بیماران نیز اندازه‌گیری شد و بر اساس درجه‌بندی ۱+ تا ۴+ طبقه‌بندی گردید. در جدول ۳، درجات دفع پروتئین از ادرار بیماران (Proteinuria) آمده است.

همان‌طور که مشخص است، درجه‌ی پروتئین‌آوری ۵۸ درصد از بیماران، +++ و در ۲۰ درصد نیز ++++ بود. به عبارت دیگر، از بین تمامی بیماران، ۷۸ درصد دارای درجه‌ی پروتئین‌آوری +++ و بالاتر بودند.

وجود آسیت و مصرف داروهای تضعیف‌کننده‌ی سیستم ایمنی (۷) می‌باشد. به طور مشخص دیده می‌شود که بعضی از بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک، بیشتر از سایر بیماران دچار عفونت می‌شوند. بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک، مستعد به ایجاد لخته به دلیل دفع پروتئین‌های ضد انعقاد C و S و آنتی‌ترومبین ۳ می‌باشند (۸).

سندرم نفروتیک اولیه در پسرها شایع‌تر است و سن شایع بروز بیماری ۲-۶ سالگی است. از جمله عواملی که باعث سیر پیش‌رونده‌ی بیماری می‌شوند، سن بالا، علایم نارسایی کلیه و پروتئین‌آوری شدیدتر است (۹). در مطالعه‌ی Loscalzo، در مورد ترومبوز وریدی در مبتلایان به سندرم نفروتیک، مشخص گردید که حوادث ترومبوتیک در ۲۵ درصد از این بیماران یافت می‌شود که علت آن، کاهش آلبومین و دفع پروتئین‌های ضد انعقادی بود (۴).

با توجه به این که برای ۹۰ درصد از موارد ابتلا به این بیماری علت خاصی یافت نمی‌شود، در نتیجه مؤثرترین کار برای مقابله با این بیماری، شناخت عوارض آن و جلوگیری از آن‌ها می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی میزان بروز هر کدام از عوارض این بیماری انجام شد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر است که با هدف تعیین بروز عوارض مربوط به سندرم نفروتیک در کودکان انجام شده است. در این مطالعه، کلیه‌ی بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک که در سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ در مرکز آموزشی-درمانی کودکان امام حسین (ع) اصفهان بستری شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند.

اطلاعات مورد نیاز با مراجعه به بخش بایگانی مدارک پزشکی بیمارستان جمع‌آوری شد و پرونده‌های بیماران برای اطلاعات مورد نیاز بازخوانی گردید. جهت تعیین بیماران، کلیه‌ی بیمارانی که در پرونده‌ی آن‌ها تشخیص نهایی سندرم نفروتیک درج شده بود، وارد مطالعه شدند. بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک ثانویه مثل لوپوس، HSP (Henoch-SchOnlein Purpura)، عفونت و بدخیمی، از مطالعه حذف شدند.

اطلاعات شامل سن (سال)، جنس، فشار خون سیستول و دیاستول (mmHg)، مدت بستری (روز)، تعداد عود، میزان آلبومین (g/dl)، کراتینین (g/dl)، کلسترول (mg/dl)، تری‌گلیسرید (mg/dl) و پروتئین ادرار (mg/24 hours) و همچنین میزان تصفیه‌ی گلوبومرولی (GFR یا Glomerular filtration rate) (mg/minute)، از پرونده‌ی مربوط به آخرین بستری آنان استخراج شد.

داده‌ها وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) گردید و با استفاده از

جدول ۲. مشکلات و عوارض مربوط به بیماران و درصد بروز آنها

نوع عارضه	دارد (درصد)	ندارد (درصد)
پرفشاری خون سیستول	۳۹/۳	۶۰/۷
پرفشاری خون دیاستول	۳۶/۴	۶۳/۶
هیپرلیپیدمی	۹۰/۳	۹/۷
آلبومین	کمتر از ۲/۵ g/dl	بیشتر از ۲/۵ g/dl
میزان تصفیه‌ی گلوبولین	کم	طبیعی
	۸۸/۴	۱۱/۶

بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک را در تهران بررسی کردند، حدود ۸ درصد بیماران دارای فشار خون بالا بودند (۱۲).

همچنین، در مطالعه‌ی مهدوی مزده و همکاران که علایم آزمایشگاهی مبتلایان به سندرم نفروتیک را بررسی کردند، ۹۴ درصد بیماران ادم، ۲۲ درصد فشار خون بالا و ۵۸ درصد هماچوری داشتند. ۳۰ درصد از بیماران کراتینین بالاتر از حد طبیعی داشتند و پروتئین‌اوری در ۸۲ درصد از بیماران کمتر از ۶ و در ۱۸ درصد بیش از ۶ گرم بود (۱۳).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که عوارض و پیامدهای ناشی از سندرم نفروتیک، می‌تواند علاوه بر مشکلات ناشی از خود بیماری، بار اضافی بر خود بیمار و خانواده‌ی وی تحمیل کند. از آن جایی که سیر درمانی و بهبودی این بیماران بسیار کند و وابسته به زمان است و بهبودی کامل نیز وجود ندارد؛ لازم است با شناخت عوارض این بیماری به درمان علامتی و جلوگیری از پیشرفت عوامل خطر اقدام نمود تا بیماری‌ها و مشکلات ثانویه به وجود نیاید.

از آن جایی که بسیاری از بیماریها ریشه در دوران کودکی و نوجوانی دارند، اهمیت رسیدگی و درمان بیماران در گروه کودکان و نوجوانان بیش از سایر گروه‌های سنی به نظر می‌رسد و جهت این گروه سنی، باید مراقبت‌ها و اقدامات فوری درمانی و پیش‌گیرانه را لحاظ نمود.

مطالعه‌ی حاضر، یک مطالعه‌ی مبتنی بر داده‌های بیمارستانی است و احتمال خطا در این گونه داده‌ها بیش از سایر مطالعات است؛ اما به هر حال، با توجه به این که تمامی بیماران بستری شده در بیمارستان کودکان مورد مطالعه قرار گرفتند و این بیمارستان، یک بیمارستان مرجع است که از سایر نقاط کشور نیز پذیرش دارد، اطلاعات جامعی از پیامدها و عوارضی که این گونه بیماران را درگیر می‌کند فراهم می‌سازد.

جهت مطالعات بعدی، می‌توان تأثیر مداخلات درمانی را برای کاهش عوارض این بیماری بررسی و تحقیق کرد.

جدول ۳. درجات دفع پروتئین از ادرار و درصد بروز هر یک در بیماران

درجه‌ی پروتئین‌اوری	درصد بیماران
+	۵/۰
++	۱۶/۸
+++	۵۸/۰
++++	۲۰/۲

با استفاده از آزمون χ^2 به بررسی اختلاف و تفاوت نسبت عوارض ذکر شده در بالا بین دو جنس مذکر و مؤنث پرداختیم. در بین متغیرهای ذکر شده، تنها نسبت هیپرلیپیدمی بین دو جنس تفاوت معنی‌داری داشت ($P = ۰/۰۴$).

بحث

هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی پیامدها و عوارض بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک بستری در بیمارستان کودکان امام حسین (ع) اصفهان بود. ویژگی‌های آزمایشگاهی مختلف سنجیده و گزارش شد. بسیاری از بیماران مبتلا به سندرم نفروتیک، علاوه بر ناراحتی‌های خود بیماری، متحمل پیامدهای ناشی از وجود بیماری می‌شوند.

برای مثال در مطالعه‌ی حاضر، بسیاری از بیماران به ناخوشی‌هایی گرفتار بودند که با توجه به سن آنها، نامعمول بود. درصد قابل توجهی از بیماران به پرفشاری خون مبتلا بودند. همچنین، افزایش چربی‌های خون (کلسترول و تری‌گلیسرید) در نزدیک به ۹۰ درصد از بیماران مشاهده شد. میزان آلبومین و میزان تصفیه‌ی گلوبولین نیز در بسیاری از آنها مختل بود. بسیاری از این اختلالات، عوامل خطر بیماری‌های قلبی - عروقی می‌باشد که در مطالعاتی به ارتباط بین آنها و بروز بیماری‌های قلبی - عروقی پرداخته شده است (۱۰).

همچنان که در مطالعه‌ی حاضر هیپرلیپیدمی ۹۰ درصد افراد بیمار را گرفتار کرده است، مطالعه‌ی Merouani و همکاران نیز به بالا بودن چربی‌های خون در این گونه بیماران اشاره کرده است (۱۱). در مطالعه‌ی عطایی و همکاران که سیر بالینی و عوامل خطر

به شماره‌ی ۲۹۳۲۰۰ می‌باشد. بدین وسیله از این معاونت محترم و نیز تمامی افرادی که در اجرای این پژوهش همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان اصفهان

References

- Mendoza SA, Tune BM. Management of the difficult nephrotic patient. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42(6): 1459-68.
- Alshaya HO; Kari J. Levamisole treatment in steroid sensitive nephrotic syndrome. *Saudi Med J* 2002; 23(9): 1101-4.
- Goldblum SE, Reed WP. Host defenses and immunologic alterations associated with chronic hemodialysis. *Ann Intern Med* 1980; 93(4): 597-613.
- Loscalzo J. Venous thrombosis in the nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368(10): 956-8.
- Seimiya M, Ohno S, Asano H, Fujiwara K, Yoshida T, Sawabe Y, et al. Change in albumin measurement method affects diagnosis of nephrotic syndrome. *Clin Lab* 2014; 60(10): 1663-7.
- Soares SF, Donatti TL, Souto FJ. Serological markers of viral, syphilitic and toxoplasmic infection in children and teenagers with nephrotic syndrome: case series from Mato Grosso State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56(6): 499-504.
- Gulati S, Kher V, Arora P, Gupta S, Kale S. Urinary tract infection in nephrotic syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(3): 237-40.
- Gulati S, Kher V, Gupta A, Arora P, Rai PK, Sharma RK. Spectrum of infections in Indian children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1995; 9(4): 431-4.
- Wemmer U. Nephrotisches Syndrom. Available from: URL:<http://www.kindernetzwerk.de/images/Krankheitsuebersichten/Krankheitsuebersichten-nephrotisches-syndrom.pdf>. [In German].
- McCordle BW, Urbina EM, Dennison BA, Jacobson MS, Steinberger J, Rocchini AP, et al. Drug therapy of high-risk lipid abnormalities in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Youth Committee, Council of Cardiovascular Disease in the Young, with the Council on Cardiovascular Nursing. *Circulation* 2007; 115(14): 1948-67.
- Merouani A, Levy E, Mongeau JG, Robitaille P, Lambert M, Delvin EE. Hyperlipidemic profiles during remission in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Biochem* 2003; 36(7): 571-4.
- Ataei N, Madani A, Falakolafaki B. Evaluation of clinical course, risk factors for relapse and long-term outcome of children with primary nephrotic syndrome. *Tehran Univ Med J* 2003; 61(4): 308-19. [In Persian].
- Mahdavi Mazdeh M, Samimi R, Lesan Pezeshki M, Ahmadi F, Khatami MR, Seifi S, et al. To determine the correlation of the histological picture of renal biopsy specimens with clinical signs in cases of nephritic syndrome. *Daneshvar Med* 2005; 56(12): 53-6. [In Persian].

Complications of Children with Nephrotic Syndrome Hospitalized at Imam Hossein Pediatric Hospital, Isfahan, Iran

Zahra Joshaghani¹, Alaleh Gheisari MD², Mojtaba Keikha MSc³

Original Article

Abstract

Background: International studies show that every year, 2-7 new cases of primary nephrotic syndrome in every 100,000 children of under-16-year age occur and its prevalence is 15.7 per 100,000 children. Nephrotic syndrome is diagnosed with high urinary protein excretion, low blood protein and high blood lipids.

Methods: This retrospective study was done to determine the incidence of complications related to nephrotic syndrome in children. All the children with nephrotic syndrome admitted in Imam Hossein Pediatric Hospital, Isfahan, Iran, during 2013-2014, entered the study. Information such as age, sex, systolic and diastolic blood pressure (mmHg), length of hospitalization (day), number of relapses, albumin (g/dl), creatinine (g/dl), cholesterol (mg/dl), triglycerides (mg/dl) and urine protein levels (mg/24 hours) and glomerular filtration rate (GFR) (mg/minute) of the patient were collected from their last medical records.

Findings: The mean age of patients was 21.8 with a standard deviation of 8.3 years. The most frequent age was 5 years old. 39.3% of patients had increased systolic blood pressure and 36.4% of them had high diastolic blood pressure. In addition, 90.3% of patients had abnormal blood fat (triglycerides or cholesterol increase). 41.9% and 88.4% of patients had impaired albumin and glomerular filtration rates, respectively. 58.0% of patients had +++ proteinuria, as well as 20.2% of them had ++++ proteinuria.

Conclusion: Since the treatment and recovery of patients with nephrotic syndrome is very slow and time-dependent and there is not full recovery, we must recognize the symptoms and prevent progression to symptomatic treatment of the diseases; risk factors should be taken to avoid creating secondary problems, too.

Keywords: Nephrotic syndrome, Complications, Children

Citation: Joshaghani Z, Gheisari A, Keikha M. **Complications of Children with Nephrotic Syndrome Hospitalized at Imam Hossein Pediatric Hospital, Isfahan, Iran.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(359): 1999-2003

1- Nurse, Imam Hossein Pediatric Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

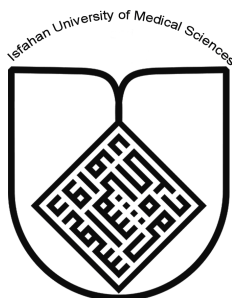
2- Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Epidemiologist, Child Growth and Development Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mojtaba Keikha MSc, Email: mr.mojtabakeikha@gmail.com

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. 359, 3rd Week January 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 indexes

- | | |
|---|--|
| ■ Scopus | ■ Google Scholar |
| ■ Chemical Abstracts | ■ Index Copernicus |
| ■ Islamic World Science Citation Center (ISC) | ■ Directory of Open Access Journal (DOAJ) |
| ■ Academic Search Complete EBSCO Publishing databases | ■ Index Academicus |
| ■ WHO/EMRO/Index Medicus | ■ 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.