دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

هفته‌نامه

سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/ هفته چهارم اسفند ۱۳۹۴

شماره استاندارد بین المللی: ۱۰۲۷-۷۵۹۵
شماره استاندارد آن لاین: ۱۷۳۵-۸۵۴x

Print ISSN: 1027-7595
Online ISSN: 1735-854x

Weekly

Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016

مقاله‌های پژوهشی

آلودگی آرد و انواع نان به آفلاتوکسین و ارزیابی خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف نان در ایران ۲۴۲۰
سمیرا شکری جوکاری، دکتر مریم میرلوحی، دکتر لاله مشرف

ارتباط میان چاقی با یبوست و یبوست عملکردی در بزرگسالان ایرانی ۲۴۲۹
نجمه سالک، عادله دادخواه، پروانه صانعی، دکتر عمار حسن‌زاده کشتلی، دکتر احمد اسماعیل‌زاده، دکتر پیمان ادیبی

بررسی فراوانی نسبی دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و مقایسه با گروه شاهد ۲۴۴۰
دکتر بهرام پاکزاد، نیما عباسی ولدانی، مجتبی اکبری

تأثیر پروبیوتیک در درمان یبوست عملکردی کودکان ۱۲-۴ سال ۲۴۴۸
دکتر معصومه عابدینی، دکتر پدرام عطایی، دکتر عبدالرحیم افخم‌زاده، دکتر مریم سیف منش، دکتر بنفشه صداقت

بروز مقایسه‌ای پروتئین مهار کننده‌ی تومور Breast Cancer (BRCA) در نمونه‌های سرطانی و سالم کولورکتال ۲۴۵۵
دکتر مهدی نیکبخت دستجردی، وحید کاشانیان

بررسی القای آپوپتوزیس ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه در رده‌ی سلولی ملانوما در مقایسه با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان ۲۴۶۱
نسیم دانا، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد، لاله رفیعی

مقاله مروری

نسل جدید روش‌های توالی‌یابی و کاربردهای آن ۲۴۶۹
میثم مصلایی، حامد میرزایی، میگانوش سیمونیان، دکتر مجید خیرالهی

Original Articles

Flour and Bread Aflatoxin Contamination and Risk Assessment of Aflatoxin Intake through Bread Consumption in Iran 2428
Samira Shokri-Jokari, Maryam Mirlohi PhD, Laleh Mosharraf PhD

The Association between Obesity, Constipation, and Functional Constipation in Iranian Adults 2439
Najmeh Salek, Adeleh Dadkhah, Parvaneh Saneei MSc, Ammar Hassanzadeh-Keshteli MD, Ahmad Esmaillzadeh PhD, Peyman Adibi MD

Determination of Frequency of Diabetes and Pre-Diabetes in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Comparison with a Control Group 2447
Bahram Pakzad MD, Nima Abbasi-Veldani, Mojtaba Akbari MSc

The Effect of Probiotics on the Treatment of Functional Constipation in Children of 4–12 Years of Age 2454
Masoumeh Abediny MD, Pedram Ataiee MD, Abdorahim Afkhamzadeh MD, Maryam Seifmanesh, Banafsheh Sedaghat

Comparative Expression of Breast Cancer 1 Tumor Suppressor Protein in Cancerous and Healthy Colorectal Specimens 2460
Mehdi Nikbakht-Dastjerdi PhD, Vahid Kashanian

Comparison of the Apoptosis Induction Effect of Pomegranate Peel Extract on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Melanoma 2468
Nasim Dana MSc, Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD, Laleh Rafiee MSc

Review Article

Next-Generation Sequencing and its Applications 2480
Meysam Mosallayi, Hamed Mirzaei MSc, Miganoosh Simonian, Majid Kheirollahi PhD

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و سوم، شماره (۳۶۸)، هفته چهارم اسفند 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
مسؤول دفتر: گلناز رجبی
تلفن: ۳۶۶۹۴۷۳۷-۰۳۱ **دورنگار:** ۳۷۹۲۲۲۹۱-۰۳۱
E-mail: jims@med.mui.ac.ir
وب سایت مجله: http://www.journals.mui.ac.ir/jims

امور نشر:
(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)
شرکت فرزانگان راداندیش
اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵
تلفن و دورنگار: ۳۶۶۸۶۳۰۲-۰۳۱
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 ایمونولوی، 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 عادلی	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۲۶- دکتر سعید عندلیب	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لویس 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، امریکا
۳۲- دکتر منصور کارآموز	استاد، متخصص اورولوژی، کالیفرنیا، امریکا
۳۳- دکتر رویا کلیشادی	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 اتیه مغیثی	استاد، متخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، امریکا
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، ایران
۴۴- دکتر علی محمد هنجنی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی 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 منحصرا 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، حتما 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 می کنند 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 فایل ها، 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 تائیدیه 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 می باشد. 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 می شود.

- 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 می یابد.

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

ج- مقالات مروری ـ 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 حتما 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 به‌صورت 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 ۱۰۰۰کلمه؛ 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 ۱۰۰۰کلمه؛ سقف مجموع جداول و تصاویر ۵، سقف منابع و مآخذ ۱۵ عدد می‌باشد.

تبصره ۱ـ 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 به‌همراه 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 مستقیما 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 نرم‌افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد.

در صورتی که مطالعه دارای پرسش‌نامه یا چک لیست است، ضمیمه کردن آن لازم است؛ 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 دست نوشته، علاوه بر ارجاع در متن، محل قراری‌گیری 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 دست نوشته (پس از منابع) قرار داده شوند.جدول ها باید دارای زمینه سفید و بدون سایه و ترام باشد. جداول باید توسط نرم‌افزار MS Word و فاقد هرگونه صفحه آرایی، فاصله خطوط ۱ برابر (Single)، قلم B Zar و سایز ۱۰و قلم متغیرهای هر ستونB Zar و سایز ۱۰ Bold تهیه شوند. برای تایپ کلمات لاتین در جدول از قلمTime 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.

تبصره۱- 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 صورتی‌که دست نوشته حاصل از پایان‌نامه دانشجویی باشد حتما بایستی در قسمت تقدیر و تشکر شماره پایان‌نامه مصوب دانشگاه و نیز نام دانشگاه ذکر گردد.

- تبصره۱- ضروری است که علاوه بر ذکر تقدیر و تشکر در صفحه عنوان، در پایان دست نوشته 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 کننده‌ی 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 پایان‌نامه

نام خانوادگی نویسنده (فاصله) حرف اول نام کوچک نویسنده (.) عنوان پایان‌نامه (فاصله) [مقطع پایان‌نامه] (.) 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

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

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

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

- پس از انتشار، نسخه ای برای نویسنده مسؤول 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 روش‌ها اشاره گردند. اخذ رضایت‌نامه از کلیه‌ی 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 کننده‌ی 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، حق‌الزحمه، مواد و تجهیزات از دانشگاه‌ها، سازمان‌ها، نهادها، شرکت‌ها و سایر منابع که انتشار یافته‌های مطالعه می‌تواند به آنها سود یا زیان برساند را اعلام نمایند.

- هزینه انتشار:

محاسبه هزینه‌های دریافتی براساس جدول زیر می‌باشد:

نوع مقاله	تعداد کلمات مجاز شامل کلیه بخش‌های مقاله، رفرنس‌ها، شکل‌ها و نمودارها (هر شکل برابر ۳۰۰ کلمه محاسبه می‌شود)	هزینه دریافتی* (هزار تومان)	هزینه دریافتی به ازای هر ۵۰۰ کلمه اضافی (هزار تومان)
نامه به سردبیر	۴۰۰	–	–
گزارش مورد	۱۰۰۰	۱۰۰	۱۰۰
کوتاه	۱۰۰۰	۱۰۰	۱۰۰
پژوهشی اصیل	۲۵۰۰	۲۰۰	۱۰۰
پژوهشی اصیل (مطالعات کیفی)	۳۰۰۰	۲۰۰	۱۰۰
مروری	۷۰۰۰	۲۰۰	۱۰۰

***هزینه‌های ستون سوم صرفاً برای مقالاتی که هم نویسنده اول و هم نویسنده مسؤول هر دو وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (IUMS) باشند، مشمول ۵۰٪ تخفیف خواهد بود.**

- ۵۰ درصد کل هزینه در ابتدا و بعد از دریافت ایمیل شروع فرآیند به عنوان (Processing fee) به منظور شروع داوری دریافت می‌گردد. این هزینه غیر قابل بازگشت خواهد بود. 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 فقط جهت فرآیند داوری می‌باشد و تعهدی برای پذیرش مقاله ایجاد نمی‌نماید. ۵۰ درصد هزینه باقیمانده در صورت پذیرش نهایی مقاله به عنوان Acceptance fee دریافت خواهد شد.

- نویسنده مسؤول می بایست وجه مورد نظر را به شماره حساب ۴۹۷۵۷۶۱۰۰۷ بانک ملت بنام دانشگاه علوم پزشکی اصفهان برای پرداخت از طریق بانک‌های ملت و شماره شبا ۵۸۰۱۲۰۰۰۰۰۰۰۰۴۹۷۵۷۶۱۰۰۷ به شماره شناسه ۸۴۱۱۳۰۰۰۰۰۰۰۰۲ برای پرداخت از طریق سایر بانک‌ها واریز نماید. سپس اسکن فیش واریزی را فقط از طریق سایت به دفتر مجله ارسال نماید.

- در صورت تقاضای "بررسی سریع" (Fast track) زمان بررسی مقاله تا تصمیم گیری نهایی به ۲۱ روز تقلیل خواهد یافت. در این حالت کل هزینه به اضافه ۴۰ درصد هزینه "بررسی سریع" در ابتدای فرآیند داوری اخذ خواهد شد.

حق نسخه‌برداری (Copyright): تمامی محتویات مجله دانشکده پزشکی اصفهان تحت قانون حق نسخه‌برداری بین‌المللی قرار دارد. این مجله برای استفاده غیر تجاری در اختیار افراد قرار می‌گیرد. اصلاح، انتشار، انتقال و نمایش هر گونه محتویات مجله بدون ذکر نام این مجله ممنوع است.

- فرآیند مرور دقیق (Peer Review): تمام دست‌نوشته‌ها توسط داوران منتخب شورای نویسندگان مجله مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. نویسنده‌ی مسؤول در کوتاه‌ترین زمان در جریان تصمیم سردبیر در مورد رد، قبول یا اصلاحات مورد نظر داوران و هیأت تحریریه قرار خواهد گرفت. در صورت پذیرش مقاله برای چاپ، نامه پذیرش به همراه ایمیل برای نویسنده‌ی مسؤول ارسال می‌شود و مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت.

- هیأت تحریریه در رد، اصلاح، ویرایش و خلاصه کردن مقاله آزاد است.

-- مسؤولیت صحت یا سقم مطالب ارایه شده در مقاله بر عهده‌ی نویسنده یا نویسندگان است.

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

آلودگی آرد و انواع نان به آفلاتوکسین و ارزیابی خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف نان در ایران..... ۲۴۲۰
سمیرا شکری جوکاری، دکتر مریم میرلوحی، دکتر لاله مشرف

ارتباط میان چاقی با یبوست و یبوست عملکردی در بزرگسالان ایرانی..... ۲۴۲۹
نجمه سالک، عادله دادخواه، پروانه صانعی، دکتر عمار حسن‌زاده کشتلی، دکتر احمد اسماعیل‌زاده، دکتر پیمان ادیبی

بررسی فراوانی نسبی دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و مقایسه با گروه شاهد..... ۲۴۴۰
دکتر بهرام پاکزاد، نیما عباسی ولدانی، مجتبی اکبری

تأثیر پروبیوتیک در درمان یبوست عملکردی کودکان ۱۲-۴ سال..... ۲۴۴۸
دکتر معصومه عابدینی، دکتر پدرام عطایی، دکتر عبدالرحیم افخم‌زاده، دکتر مریم سیف منش، دکتر بنفشه صداقت

بروز مقایسه‌ای پروتئین مهار کننده‌ی تومور Breast Cancer (BRCA) در نمونه‌های سرطانی و سالم کولورکتال..... ۲۴۵۵
دکتر مهدی نیکبخت دستجردی، وحید کاشانیان

بررسی القای آپوپتوزیس ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه در رده‌ی سلولی ملانوما در مقایسه با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان..... ۲۴۶۱
نسیم دانا، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد، لاله رفیعی

مقاله مروری

نسل جدید روش‌های توالی‌یابی و کاربردهای آن..... ۲۴۶۹
میثم مصلایی، حامد میرزایی، میگانوش سیمونیان، دکتر مجید خیرالهی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۷

آلودگی آرد و انواع نان به آفلاتوکسین و ارزیابی خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف نان در ایران

سمیرا شکری جوکاری[۱]، دکتر مریم میرلوحی[۲]، دکتر لاله مشرف[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، اطلاعات کمی از شیوع آفلاتوکسین در آرد و مقایسه‌ی آن در نان‌های سنتی و حجیم موجود در بازار منتشر شده است. در پژوهش حاضر، حدود آلودگی به آفلاتوکسین در برخی از محصولات نانوایی و ارزیابی خطر دریافت آن مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مقطعی- تجربی، ۶۶ نمونه شامل ۲۹ نمونه‌ی مختلف آرد ستاره، ۱۴ نمونه‌ی نان سنتی، ۱۰ نمونه‌ی نان حجیم و ۱۳ نمونه‌ی مغز برای تزیین نان به صورت تصادفی از کارخانه‌ها و نانوایی‌های مختلف استان اصفهان جمع‌آوری و از نظر حضور باقی‌مانده‌ی آفلاتوکسین به روش کیت اختصاصی Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) بررسی شد. ارزیابی خطر دریافت آفلاتوکسین برای مصرف کنندگان با استفاده از شاخص خطر محاسبه و داده‌ها به کمک آزمون‌های آماری One-way ANOVA و آزمون Fishers least significant difference (Fisher's LSD) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: کلیه‌ی نمونه‌های مورد مطالعه، حاوی آفلاتوکسین در محدوده‌ی ۰/۵-۶/۵۴ قسمت در بیلیون (Parts per billion یا ppb) و کمتر از حد استاندارد ملی ایران (۱۵ ppb) تشخیص داده شدند. محدوده‌ی آلودگی در نان‌های سنتی دو برابر نان‌های حجیم محاسبه گردید. ضریب خطر بین ۱۰۱-۵/۴ و عامل خطر اضافی بروز سرطان در طول عمر بالاتر از $۱۰^{-۴}$ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: اگر چه نتایج بررسی میزان باقی‌مانده‌ی آفلاتوکسین در نمونه‌های آرد و نان، نشان دهنده‌ی نمای ایمنی از نظر آلودگی نان به آفلاتوکسین است، اما بالاتر بودن ضریب خطر برآورد شده از دریافت آفلاتوکسین در نان، نسبت به حدود قابل تحمل برای بدن نشان دهنده‌ی لزوم کاهش سرانه‌ی مصرف نان در رژیم غذایی است.

واژگان کلیدی: آرد، آفلاتوکسین، ارزیابی خطر، Enzyme-linked immunosorbent assay، نان

ارجاع: شکری جوکاری سمیرا، میرلوحی مریم، مشرف لاله. **آلودگی آرد و انواع نان به آفلاتوکسین و ارزیابی خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف نان در ایران.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۲۸-۲۴۲۰

مقدمه

بر اساس عادات غذایی مرسوم در ایران، به طور معمول نان بخش مهمی از رژیم غذایی را تشکیل می‌دهد. علاقه و سلیقه‌ی ایرانی در انتخاب و مصرف نان را می‌توان در تولید تجاری و گسترده‌ی انواع نان‌های سنتی مانند سنگک، بربری، لواش و تافتون مشاهده کرد که از سال‌های دور همچنان بخش مهمی از بازار نان را به خود اختصاص می‌دهند (۱). مصرف سرانه‌ی نان در ایران، بین ۱۶۴-۱۳۹ کیلوگرم در سال است (۲) که در مقایسه با کشورهای غربی مثل سوئیس، فرانسه، آمریکا و آلمان با مصرف سرانه به ترتیب ۴۱، ۵۳-۵۶، ۲۹-۲۶ و ۸۵-۸۰ کیلوگرم، به مراتب بسیار بالاتر است. مصرف سرانه‌ی نان در ایران حتی نسبت به برخی از کشورهای آسیایی مثل هند با ۹۷ کیلوگرم مصرف سرانه‌ی نان و ترکیه با شباهت‌های فرهنگی بیشتر که سرانه‌ی مصرف نان در آن ۱۰۰ کیلوگرم ذکر شده است، نیز بسیار بالاتر است (۳).

مهم‌ترین مشکل رواج و مطلوبیت نان‌های سنتی در ایران، بالا بودن ضایعات پس از تولید آن‌ها می‌باشد. طبق مطالعات صورت گرفته، مقدار ضایعات نان در شهر تهران ۱۳/۵ درصد برآورد شده است (۴). این موضوع، موجب شده است تا سیاست‌گذاران در

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه صنایع غذایی، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مریم میرلوحی
Email: m_mirlohi@hlth.mui.ac.ir

سال‌های اخیر، با انواع تمهیدات سعی بر رواج نان حجیم با اختصاص سهم بیشتری به آنان در بازار داشته باشند. تشویق تولید کنندگان برای تولید بیشتر این نوع نان با اختصاص یارانه‌ی آرد و آموزش و معرفی انواع متنوع نان حجیم و ارزش تغذیه‌ی آن‌ها برای مصرف کنندگان از جمله‌ی این فعالیت‌ها در سال‌های اخیر بوده است (۵).

کیفیت نان‌های عرضه شده در بازار از نظر آلودگی به سموم قارچی، یکی از مسایل مهم در سلامت مصرف کنندگان و عموم جامعه است. تاکنون چندین مطالعه در مورد شیوع و فراوانی مایکوتوکسین‌ها در گندم، آرد و نان صورت گرفته است و در مورد هر سه محصول، گستره‌ی بسیار متفاوتی از آلودگی گزارش شده است. برای مثال، از دو مطالعه‌ی بررسی شیوع آفلاتوکسین در دانه‌ی گندم که در شمال کشور صورت گرفته است، یکی ۲۴ درصد از نمونه‌های گندم مورد مطالعه را غیر قابل مصرف گزارش کرد (۶)؛ در حالی که در مطالعه‌ی دیگر، هیچ نمونه‌ی غیر قابل مصرفی تشخیص داده نشد (۷). در مورد آرد گندم، در کشور دو گزارش از بررسی میزان آفلاتوکسین در منابع علمی منتشر شده است. در این مورد نیز گستره‌ی وسیعی از آلودگی گزارش شده است. بهفر و همکاران در خوزستان با بررسی آفلاتوکسین در ۳۲ نمونه‌ی آردگندم، گزارش کردند که با وجود شیوع آلودگی در همه‌ی نمونه‌های مورد مطالعه، آلودگی هیچ کدام از نمونه‌ها فراتر از حدود مجاز نبوده است (۸). کوهیان و همکاران با مطالعه‌ی ۱۶ نمونه‌ی آرد گندم با روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)، گزارش کردند که ۸/۱۲ درصد از نمونه‌های آرد، ۴/۳۷ درصد از نمونه‌های برنج، ۲۱/۲۵ درصد از نمونه‌های پنیر و ۵/۶۲ درصد از نمونه‌های ماست به آفلاتوکسین آلوده بودند و تنها دو مورد از نمونه‌های مورد بررسی (۱/۲۵ درصد) دارای آلودگی بیش از حد مجاز و غیر قابل مصرف تشخیص داده شد (۹).

نکته‌ی قابل توجه در مطالعات صورت گرفته در مورد آرد، عدم توجه به طبقه‌بندی آردهای مورد آزمایش بر اساس مورد مصرف آن‌ها در تهیه‌ی نان بوده است. تنها یک مطالعه در مورد آرد مورد استفاده برای نان سنگک حدود آلودگی به آفلاتوکسین را به طور قابل توجهی بیش از حد مجاز نشان داده است (۱۰). در مورد شیوع آلودگی انواع نان به سموم قارچی، تاکنون اطلاعات کمی از غلظت آفلاتوکسین در ایران منتشر شده است؛ به طوری که تنها مطالعه‌ی موجود، از شیوع اکراتوکسین در ایران، حدود ۲۰ درصد از نان‌های عرضه شده در شهرکرد را حاوی حدود بالاتراز غلظت استاندارد اکراتوکسین و غیر قابل مصرف گزارش کرده است. بر اساس این مطالعه، آلودگی نان‌های سنتی و گسترده، نسبت به انواع نان باگت و حجیم، حدود ۳ برابر ارزیابی شد (۱۱).

ایمنی غذا، یک اصل اساسی و مورد توجه در سلامت عمومی جامعه است و فرایند «ارزیابی خطر»، راهی مشخص در جهت تسهیل در تصمیم‌گیری در مورد مواد مخاطره‌آمیز در مواد غذایی است. با توجه به این که یکی ازمهم‌ترین مشکلات مایکوتوکسین‌ها، خاصیت تجمع پذیری آن‌ها در بدن انسان است، محاسبه‌ی نسبت مواجهه در طول عمریک فرد به حدود مجازتعیین شده، می‌تواند نشان دهنده‌ی نسبت دریافت روزانه‌ی آلوده کننده به طور مزمن باشد. این موضوع، توسط Li و همکاران و همچنین Wang و همکاران با استفاده از شاخص خطر Hazard quotient مورد بررسی قرار گرفت (۱۳-۱۲).

با توجه به رویکرد گسترش مصرف نان‌های حجیم و خلأ اطلاعاتی موجود از غلظت آفلاتوکسین در آرد اختصاص یافته برای این نان‌ها، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی این موضوع و خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف دو گروه نان سنتی و حجیم در جامعه‌ی ایرانی تعیین گردید. به دلیل تنوع در انواع نان‌های سنتی، از دو نوع نان سنگک و بربری به عنوان نماینده‌ی نان سنتی استفاده شد.

روش‌ها

این تحقیق، به شکل یک مطالعه‌ی تحلیلی از نوع تجربی انجام شد. در این مطالعه، جامعه‌ی آماری شامل آرد مورد استفاده برای تهیه‌ی چند نوع نان حجیم (n = ۲۹) شامل ۲۴ نمونه‌ی آرد سفید، ۳ نمونه‌ی آرد روگن و ۲ نمونه‌ی آرد سوخاری بود. نان حجیم (n = ۱۰) شامل ۷ نمونه‌ی باگت و ۳ نمونه‌ی نان همبرگر، نان سنتی شامل نان سنگک (n = ۱۰)، نان بربری (n = ۴) و اجزای مورد استفاده برای تهیه‌ی نان شامل کنجد سیاه (n = ۴)، کنجد سفید (n = ۵) و مغز تخمه (n = ۴) بود. لیست کارخانه‌ها و نانوایی‌ها از اداره‌ی بهداشت و نظارت بر مواد غذایی استان اصفهان تهیه گردید. نمونه‌های آرد از چند شرکت اصلی توزیع کننده‌ی آرد نان حجیم شامل غنچه، لاله و مطهر، کیار، هرند، زاینده‌رود و بهارستان و نمونه‌های نان، کنجد و مغز تخمه، از نانوایی‌هایی سطح شهر جمع‌آوری شد. مراحل نمونه‌گیری بر اساس استاندارد شماره‌ی ۱۲۰۰۵ سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (روش نمونه‌برداری محصولات کشاورزی جهت آزمون آفلاتوکسین) انجام گرفت. نمونه‌ها در شرایط مناسب ۴-۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام مطالعه، در شرایط ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

اندازه‌گیری آفلاتوکسین با کیت تجاری بر اساس روش ELISA: استخراج نمونه‌ها مطابق دستورالعمل کیت صورت گرفت. در مرحله‌ی استخراج، حدود ۳۰ گرم از هر نمونه آسیاب شد تا ترکیب بسیار همگنی به دست آمد. سپس ۳ گرم از نمونه‌ی آسیاب شده، داخل یک لوله‌ی آزمایش ریخته شد و ۹ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به

آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه Shake شد. مخلوط حاصل، به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از قسمت رویی، با ۱۵۰ میکرولیتر Dilution buffer رقیق گردید. سطح آلودگی نمونه‌های آماده‌سازی شده، با RIDASCREEN و استفاده از روش ELISA به کمک کیت (ساخت کشور هلند) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، اندازه‌گیری شد.

به این منظور، ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده به کمک سمپلر به حفره‌های میکروپلیت اضافه شد. برای هر استاندارد و نمونه، سرسمپلر جداگانه مورد استفاده قرار گرفت. ۲۵ میکرولیتر محلول کنژوگه و ۲۵ میکرولیتر محلول آنتی‌بادی (Aflatoxin-A-HRP یا Aflatoxin-A-horseradish peroxidase) به حفره‌های میکروپلیت اضافه شد. سپس به مدت ۱ ساعت به دور از نور و در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، مایع موجود در میکروپلیت خارج شده و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قرار دادن آن به شکل وارونه بر روی کاغذهای جاذب، رطوبت مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد. آن گاه، همه‌ی حفره‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، سه بار شسته شد و هر بار، بعد از تخلیه‌ی مایع شستشو، میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار می‌گرفت تا به طور کامل باقی‌مانده‌ی آب شستشو خارج شود. به این ترتیب، موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده بودند، خارج شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به هر حفره اضافه شد و در نهایت، محلول توقف واکنش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها اضافه شد و میزان جذب هر نمونه، در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و اطلاعات مربوط به میزان جذب هر حفره به تفکیک ثبت گردید.

بازیابی روش: برای اعتبارسنجی کیت ELISA مورد استفاده، ۳ گرم نمونه‌ی آرد روگن در این مطالعه با ۵۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد ۱ قسمت در بیلیون (Parts per billion یا ppb) اسپایک شد و مطابق نمونه‌های عادی با دو بار تکرار، مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج میزان بازیابی، ۷۸/۲ درصد محاسبه گردید.

تعیین خطر دریافت سم آفلاتوکسین در نمونه‌های نان: جهت برآورد خطر بروز آثار غیر سرطان‌زایی سم آفلاتوکسین، از شاخص ضریب خطر بر اساس فرمول ۱ استفاده شد.

$$HQ = \frac{\text{Exposure dose}}{\text{RfD}}$$

$$\text{Exposure dose} = \frac{Ci \times Dv \times Ed}{Bw \times At} \text{mg/Kg/day}$$

فرمول ۱

ضریب خطر Hazard quotient (HQ)، نسبت دریافت روزانه به صورت مزمن به دز مرجع می‌باشد که دریافت آن در طول عمر، هیچ گونه عارضه‌ای ایجاد نمی‌کند. Concentration index (Ci)، غلظت آفلاتوکسین در مواد غذایی مختلف (ppb یا قسمت در بیلیون) و Daily value (Dv) میزان سرانه‌ی مصرف مواد غذایی (کیلوگرم/روز) می‌باشد. علاوه بر این، Exposure duration (Ed) طول عمر مواجهه و At (Average lifetime) طول عمر فرد برابر ۷۰ سال و Body weight (Bw) میانگین وزن افراد بالغ ایرانی است که ۷۰ کیلوگرم در نظر گرفته شده است.

Excess lifetime cancer risk = Exposure dose * Slope Factor

فرمول ۲

عامل ارزیابی خطر اضافی بروز سرطان در طول عمر در این معادله، شاخصی برای سرطان‌زایی سم دریافتی است و در صورتی که کمتر از یک میلیونیم محاسبه شود، شرایط قابل اغماضی را برای سرطان‌زا بودن سم دریافتی نشان خواهد داد. در صورتی که محاسبه‌ی اعداد بالاتر از ۱/۱۰۰۰۰۰ از این شاخص نشان می‌دهد که این خطر، قابل چشم‌پوشی نیست و باید به شکل دقیق‌تر و با حساسیت بیشتری مورد بررسی قرار گیرد.

در این پژوهش، از tolerable daily intake (TDI) به میزان ۰/۱۵-۰/۱۹ نانوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه (۱۴) و Provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) به میزان ۱ نانوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه (۱۵) به عنوان شاخص مرجع و از Cancer slope factor (SFC) $^{-1}$۲۹۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه، به عنوان شیب سرطان‌زایی برای انجام محاسبات استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) صورت گرفت. میانگین تکرار آزمایش‌ها در هر مرحله، با استفاده از آزمون Repeated measures one-way ANOVA با ضریب اطمینان ۹۵ درصد به دست آمد. جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها، از آزمون تعقیبی Fishers least significant difference (Fisher's LSD) انجام شد.

یافته‌ها

در جدول ۱، میانگین غلظت و حدود آلودگی به آفلاتوکسین در کلیه‌ی نمونه‌های آرد، نان و مغزهای مورد استفاده در تهیه‌ی نان در این تحقیق آمده است. کلیه‌ی نمونه‌های مورد مطالعه، حامل آفلاتوکسین در محدوده‌ی بین ۰/۵-۶/۵۴ قسمت در بیلیون بودند. با

این حال، حدود آلودگی در هیچ نمونه‌ای از حد استاندارد ملی (۱۵ قسمت در بیلیون) فراتر نبود. فراوانی شیوع آفلاتوکسین در بین نمونه‌های آرد مورد بررسی، نشان داد که آرد روگن بالاترین آلودگی را داشت. بر اساس آزمون One-way ANOVA با اطمینان ۹۵ درصد، اختلاف آماری معنی‌داری بین غلظت آلودگی در نمونه‌های آرد مورد بررسی مشاهده شد ($P \leq ۰/۰۵$). مقایسه‌ی میانگین غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌ی آردهای ستاره، روگن و سوخاری با آزمون Fisher's LSD نشان داد که بین میانگین نمونه‌های آرد ستاره با آرد روگن، از نظر آماری با سطح اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P \leq ۰/۰۵$) (جدول ۱).

میانگین غلظت سم در کلیه‌ی انواع نان مورد بررسی، ۰/۹۲ ± ۱/۹۹ قسمت در بیلیون محاسبه شد که نمای ایمنی از غلظت آفلاتوکسین در انواع نان موجود در بازار را نشان می‌دهد. با این حال، بر اساس نتایج آزمون One-way ANOVA اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌های مختلف نان مشاهده شد ($P \leq ۰/۰۵$).

نان‌های سنتی (سنگک و بربری) به طور قابل توجهی آلوده‌تر از نان‌های حجیم (نان باگت و همبرگر) ارزیابی شدند. در نان سنتی، ۱۰۰ درصد نمونه‌های مورد بررسی به آفلاتوکسین آلوده بودند؛ در حالی که در نان حجیم سه نمونه حاوی مقادیر غیر قابل ردیابی تشخیص داده شدند. مقایسه‌ی میانگین آلودگی با آزمون تعقیبی Fisher's LSD نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار بین نان سنگک و نان بربری ($P > ۰/۰۵$)، نان باگت و نان همبرگر ($P > ۰/۰۵$) و تفاوت معنی‌داری از میانگین حدود آلودگی بین دو گروه نان سنتی و صنعتی بود ($P < ۰/۰۵$).

در رابطه با مغزهای مورد استفاده برای تزیین نان، شیوع فراوانی آفلاتوکسین در نمونه‌های کنجد سفید،کنجد سیاه و مغزتخمه، پایین‌تر ازحد استاندارد ملی ایران (۱۵ قسمت در بیلیون) مشاهده شد. آزمون One-way ANOVA و آزمون Fisher's LSD اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین نمونه‌های کنجد و مغز تخمه را نشان داد ($P \leq ۰/۰۵$) (جدول ۱)؛ به طوری که میانگین آلودگی در نمونه‌های مغز تخمه حدود دو برابر نمونه‌های کنجد سیاه و سفید مشاهده شد.

در مبحث تخمین میزان خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف نان، یک چالش اساسی برای تعیین حد قابل تحمل روزانه‌ی این آلاینده وجود دارد. این عدد، به عنوان شاخص خطر مقایسه‌ای مهم در ارزیابی خطر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن جایی که برای آفلاتوکسین و مشتقات آن، خاصیت سرطان‌زایی قائل شده‌اند، در بسیاری از سازمان‌های ایمنی، اطلاعاتی واقعی از حد مجاز دریافت روزانه در قالب TDI به عنوان دز مرجع (RFD یا Reference dose) ارایه نشده است.

به این ترتیب، در برخی از منابع علمی معتبر یا بر حسب ادعای برخی از محققان متخصص در این امر، اعداد و ارقام مختلفی گزارش گردیده است. مشکل این است که این اعداد، تا حدودی با یکدیگر متفاوت هستند؛ از این رو، در مطالعه‌ی حاضر با توجه به جستجوی عمیقی که در کلیه‌ی موارد مربوط انجام گردید، سه عدد که در منابع علمی معتبر پیشین از آن‌ها به عنوان حد مجاز قابل تحمل روزانه یا دز مرجع استفاده شده بود، استخراج و به عنوان منبع مقایسه، در جدول مورد استفاده قرار گرفت. بدون در نظر گرفتن آثار سرطان‌زایی آفلاتوکسین، بر اساس این جدول ضریب خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف، از ۱۰۱-۵/۴ متفاوت می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۱. فراوانی و میزان سم آفلاتوکسین (نانوگرم بر گرم)در نمونه‌های مختلف مورد مطالعه

	نمونه	تعداد (درصد)	میانگین ± انحراف معیار*	حداقل آلودگی	حداکثر آلودگی	مقدار P
A	آرد ستاره	۲۴ (۱۰۰)	۱/۳۲ ± ۰/۰۹^{a}	۰/۵۱	۱/۹۵	
	آرد روگن	۳ (۱۰۰)	۲/۸۶ ± ۱/۸۶^{bc}	۰/۵۰	۶/۵۴	۰/۰۱۷
	آرد سوخاری	۲ (۱۰۰)	۱/۲۶ ± ۰/۲۷^{ac}	۰/۹۹	۱/۵۴	
B	نان بربری	۴ (۱۰۰)	۲/۵۷ ± ۰/۲^{a}	۱/۷۱	۳/۴۵	
	نان سنگک	۱۰ (۱۰۰)	۲/۳۷ ± ۰/۳۸^{a}	۲/۱۰	۳/۸۴	۰/۰۰۱
	نان باگت	۷ (۷/۴۲)	۰/۸۸ ± ۰/۰۸^{b}	۰/۶۷	۱/۱۶	
	نان همبرگر	۳ (۶۶/۶)	۱/۱۵ ± ۰/۱۶^{b}	۰/۹۹	۱/۳۲	
C	کنجد سیاه	۴ (۱۰۰)	۱/۱۰ ± ۰/۰۸^{a}	۰/۹۲	۱/۲۱	
	کنجد سفید	۵ (۱۰۰)	۱/۵۰ ± ۰/۱۵^{a}	۰/۸۵	۲/۱۰	۰/۰۱۳
	مغز تخمه	۴ (۱۰۰)	۲/۲۶ ± ۰/۱۷^{b}	۱/۷۳	۲/۷۶	

* هر یک از سه گروه مواد غذایی مورد آزمایش، حروف کوچک لاتین در هر ستون نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین میانگین نتایج در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲. مقایسه‌ی ضریب خطر و خطر سرطان‌زایی سم آفلاتوکسین دریافتی از طریق مصرف [b] انواع نان

نان	Ci[a]	HQ[c]	HQ[d]	HQ[e]	Cancer Risk[f]
سنگک	۲/۴۷	۱۵/۱۷	۷۹/۸۵	۱۰۱	۰/۰۴
بربری	۲/۳۶	۱۴/۴۹	۷۶/۳۰	۹۶	۰/۰۴
باگت	۰/۸۸	۵/۴۰	۲۸/۴۵	۳۶	۰/۰۱
همبرگر	۱/۱۵	۷/۰۶	۳۷/۱۸	۴۷	۰/۰۲

[a] Ci = در نان میانگین آلودگی آفلاتوکسین (ppb یا Parts per billion)؛ b = وزن در محاسبه، میزان مصرف سرانه برای یک فرد بالغ (۷۰ kg) ۰/۴۳ kg/day در نظر گرفته شده است؛ [c] HQ = در محاسبه، شاخص مرجع PMTDI (۱ ng/kgbw.d) در نظر گرفته شده است؛ [d] HQ = در محاسبه، شاخص مرجع TDI (۰/۱۹ ng/kgbw.d) در نظر گرفته شده است؛ [e] HQ = در محاسبه، شاخص مرجع TDI (۰/۱۵ ng/kgbw.d) در نظر گرفته شده است؛ [f] Cancer slope factor = در محاسبه، $۲۹۰۰^{-۱}$ mg/kgbw.d در نظر گرفته شد.

با توجه به این که شرایط ایمنی کامل مصرف، زمانی محقق می‌گردد که ضریب خطر کمتر از عدد ۱ باشد، نتایج به دست آمده در این مطالعه، حتی با استفاده از بالاترین حدود سمیت آفلاتوکسین، شرایط مناسبی را از نظر ایمنی مصرف نان نشان نمی‌دهد. علاوه بر این، اطلاعات به دست آمده از برآورد خطر سرطان‌زایی آفلاتوکسین دریافتی از طریق مصرف نان در جدول ۲ نشان دهنده‌ی وجود خطر بیش از حد پایه‌ی ۱ نفر در هر یک میلیون نفر) برای ایجاد سرطان در جامعه مصرف کننده است.

بحث

با توجه به اهمیت و پایداری سهم مصرف نان در سبد مصرفی خانوار، تأمین ایمنی و سلامت نان تأثیر به‌سزایی در سلامت عموم و همچنین بر شاخص‌ها و متغیرهای اقتصاد کشورمان دارد. جایگاه نان و گندم در رژیم غذایی انسان اهمیت انجام تحقیقات و مطالعات مربوط به ایمنی آن را مشخص می‌کند. در سال‌های اخیر، بخشی از مطالعات بهداشت و ایمنی مواد غذایی به بررسی وضعیت آلودگی گندم، آرد و نان به انواع سموم قارچی اختصاص یافته است.

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بقایای آفلاتوکسین در همه‌ی نمونه‌های آرد و نان توزیع شده در بازار و مورد مصرف در جامعه، قابل ردیابی است. با این حال، آلودگی هیچ یک از نمونه‌ها فراتر از حد استاندارد ملی ایران نبودند؛ به طوری که بالاترین سطح آلودگی مشاهده شده در این مطالعه، کمتر از نیمی از حد مجاز باقی‌مانده‌ی آفلاتوکسین در آرد بود، اما با وجود غلظت پایین تعیین شده، محاسبات ارزیابی خطر سم دریافتی از نظر عوارض غیر از سرطان و همین‌طور سرطان‌زایی، گویای شرایط مناسبی از وضعیت فعلی نبود. نتایج بخش اول مطالعه‌ی حاضر از نظر فراوانی و گسترش آفلاتوکسین در آرد با برخی دیگر از مطالعات انجام شده در کشور در مورد آلودگی نمونه‌های گندم به آفلاتوکسین هم‌خوانی دارد.

هدایتی و محمدپور با مطالعه‌ی نمونه‌های گندم در استان مازندران گزارش کردند که میانگین غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌های گندم پایین‌تر از حدود مجاز بوده است؛ اگرچه حدود آلودگی در مطالعه‌ی آن‌ها ۳-۲ برابر بیش از غلظت‌های مشاهده شده در مطالعه‌ی حاضر بود (۱۶). در همین ارتباط کوهیان و همکاران نیز میانگین آلودگی نمونه‌های گندم موجود در انبارهای شهرتهران را پایین‌تر از حدود مجاز گزارش کردند. اگر چه در مطالعه‌ی آن‌ها دو نمونه از آرد مورد مطالعه، آلودگی بیش ار حدود مجاز نشان داد (۹). بر خلاف دو مطالعه‌ی پیش‌گفته، محمودی و همکاران در استان مازندران به بررسی آلودگی آفلاتوکسین و اکرانوکسین در ۷۰ نمونه‌ی گندم پرداختند. مقایسه‌ی حدود آلودگی در مطالعه‌ی آن‌ها با حدود مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران (آفلاتوکسین و اکراتوکسین به ترتیب ۱۵ و ۵ قسمت در بیلیون)، نشان داد که حدود آلودگی در مورد این دو مایکوتوکسین، به ترتیب در ۲۴ و ۹ درصد نمونه‌ها فراتر از حد مجاز است (۶).

تمام این مطالعات بر نمونه‌های گندم انجام شده‌اند، اما از آن جایی که در حین انجام آزمایش، نمونه‌های گندم به طور کامل همراه با سبوس آسیاب شده و به شکل نمونه‌ی آرد کامل موردآزمایش قرار می‌گیرد، پایین‌تر بودن حدود آلودگی در نتایج به دست آمده از آرد سبوس گرفته (ستاره) در مطالعه‌ی حاضر نسبت به مطالعات قبلی، قابل توجیه است. شیوع بالای آلودگی دانه‌های گندم به آفلاتوکسین و سایر سموم قارچی در برخی از مطالعات بین‌المللی نیز مشخص شده است.

نتایج این مطالعه از نظر غلظت آفلاتوکسین با نتایج مطالعه‌ی محمد حسنی و همکاران در مورد آلودگی شدید آرد کامل مورد استفاده برای تهیه‌ی نان سنگک توزیع شده در شهر اصفهان، به طور کامل متفاوت بود. با توجه به این که در هر دو مطالعه از روش آزمایشی یکسان استفاده شده است، تفاوت در محتوای سبوس در دو آرد مورد بررسی در این دو مطالعه، می‌تواند نشان دهنده‌ی آلودگی شدید سبوس‌های مورد استفاده در تهیه‌ی نان سنگک در این استان باشد. در مطالعه‌ی اخیر، نشان داده شد که بیش از ۵۰ درصد از

آفلاتوکسین در نمونه‌ی خمیر پس از فرایند تخمیر و پخت در نان کاهش پیدا می‌کند (۱۰). با این حال، نتایج پژوهش حاضر در مورد آلودگی نان سنگک نیز نشان دهنده‌ی سلامت این نان در جامعه‌ی مورد بررسی بود. شاید تفاوت در تخمیر و پخت دو گروه نان سنتی و صنعتی در اختلاف مشاهده شده از غلظت آلودگی آن‌ها به آفلاتوکسین، مؤثر بوده است.

باید توجه داشت که نان‌های حجیم مثل نان باگت و نان مخصوص همبرگر، هر دو از آرد سفید و با درجه‌ی استخراج پایین تهیه شدند؛ در حالی که در تهیه‌ی نان‌های سنتی سنگک و بربری، درصد استخراج آرد با افزودن سبوس به آن افزایش پیدا می‌کند. در همین ارتباط، Vidal و همکاران، سبوس گندم و سبوس چاودار به عنوان خارجی‌ترین جزء دانه که بالاترین احتمال آلودگی به سموم قارچی را دارا می‌باشد، علت بالا بودن آلودگی آرد سبوس‌دار نسبت به آرد سفید معرفی نمودند (۱۷).

رحیمی و همکاران، گزارش کردند که حدود آلودگی انواع نان مورد مصرف در جامعه به سم اکراتوکسین، پایین‌تر از حدود مجاز است. نتایج مطالعه‌ی آنان با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر از نظر پایین‌تر بودن میانگین غلظت سم آفلاتوکسین در انواع نان، همخوانی دارد، اما فراوانی نمونه‌های مثبت در مطالعه‌ی حاضر نسبت به مطالعه‌ی اخیر بیشتر بود؛ به طوری که در مطالعه‌ی رحیمی و همکاران، ۳۳/۳ درصد نمونه‌های نان باگت آلوده به اکراتوکسین بود، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، میزان آلودگی آفلاتوکسین در نان باگت، ۷۰ درصد محاسبه شد (۱۱).

قابل توجه است که مطالعات بین‌المللی نیز بیشتر به آلودگی انواع نان از نظر سم اکراتوکسین توجه کرده‌اند. Bento و همکاران گزارش کردند که بیش از ۵۰ درصد نمونه‌های نان در کشور اسپانیا، آلوده به اکراتوکسین هستند. با این حال، میزان آلودگی در مطالعه‌ی آن‌ها بسیار کمتر از حدود مجاز این سم در اتحادیه‌ی اروپا (۳ قسمت در بیلیون) تشخیص داده شده بود (۱۸).

در مطالعات مشابه، Zinedine و همکاران در کشور مراکش به بررسی آلودگی اکراتوکسین بر روی ۱۰۰ نمونه‌ی نان گندم پرداختند. با وجود فراوانی نسبی نمونه‌های آلوده به میزان ۴۸ درصد، حدود آلودگی در آن‌ها از ۱۴۹-۰/۱۴ قسمت در بیلیون گزارش شد و ۲۶ درصد از نمونه‌های مثبت، بیش از حداکثر سطح (۳ قسمت در بیلیون) تعیین شده توسط مقررات اروپایی برای اکراتوکسین در غلات، حبوبات و مشتقات آن ذکر گردید (۱۹). Sugita-Konishi و همکاران در ژاپن به بررسی مایکوتوکسین دئوکسی نیوالنول در ۱۴۵ نمونه‌ی آرد و نان گندم پرداختند. بر اساس نتایج مطالعه‌ی اخیر، میزان آلودگی در آرد و نان حاصل از آن به ترتیب ۷۸۰ و ۷۲۰ قسمت در بیلیون گزارش شد و به ترتیب میزان ۲۴ و ۷ درصد نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز اتحادیه‌ی اروپا (۵۰۰ قسمت در بیلیون) آلوده بودند (۲۰).

می‌توان گفت که مهم‌ترین نتیجه‌ی به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر، عدم همخوانی بخش اول مطالعه با نتیجه‌ی ارزیابی خطر دریافت آفلاتوکسین از طریق مصرف نان است. این تناقض، می‌تواند زاییده‌ی دو دلیل اصلی باشد. اول این که مصرف سرانه‌ی بالای نان موجب افزایش دریافت سم می‌شود و حتی در مقادیر ناچیز تشخیص داده شده در این مطالعه، میزان دریافت آن را افزایش می‌دهد و دلیل دیگر را می‌توان دز مرجع بسیار پایین سم آفلاتوکسین و همین‌طور شاخص شیب سرطان‌زایی بزرگ این سم دانست.

پایین بودن دز مرجع به عنوان شاخصی برای قابل تحمل بودن این سم برای بدن، باعث شده است که در مطالعات مشابه، خطر دریافت آفلاتوکسین بسیار بیشتر از سایر سموم ارزیابی شود. برای مثال در مطالعه‌ی Villa و Markaki ارزیابی خطر دریافت آفلاتوکسین B_1 و اکراتوکسین A از طریق مصرف غلات صبحانه‌ی موجود در فروشگاه‌های شهر آتن ارزیابی شد و در حالی که تنها در ۷ نمونه از ۵۵ نمونه‌ی مورد آزمایش، میزان آلودگی فراتر از حد مجاز اروپا (۱۵-۱۰ قسمت در بیلیون) گزارش شد، میانگین غلظت آفلاتوکسین B_1 در ۵۶/۳ درصد نمونه‌ها ۱/۴۲ قسمت در بیلیون و میانگین آلودگی اکراتوکسین در ۶۰/۰ درصد نمونه‌ها ۰/۱۸ قسمت در بیلیون بیان گردید. نکته‌ی قابل توجه این است که با وجود غلظت پایین هر دو سم تشخیص داده شده در نمونه‌های مطالعه‌ی اخیر، خطر دریافت اکراتوکسین از غلات صبحانه در همه‌ی گروه‌های سنی مختلف ناچیز شمرده شد، اما خطر دریافت آفلاتوکسین از مصرف ۵۰ گرم غلات صبحانه‌ی آلوده به آفلاتوکسین در کودکان با وزن ۲۰ کیلوگرم ۱۰ برابر بالاتر، مصرف ۱۰۰ گرم از غلات صبحانه در نوجوانان با وزن ۵۰ کیلوگرم و یک فرد بالغ با وزن ۷۰ کیلوگرم، ۶ برابر بالاتر از PMTDI (به میزان ۱ نانوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه) ارزیابی گردید (۱۵). به این ترتیب، خطر زیاد دریافت آفلاتوکسین از طریق مواد غذایی که غلظت سم در آن‌ها کمتر از حدود مجاز تعیین شده است، همچنان که در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد در مطالعه‌ی اخیر نیز گزارش شده است. شایان ذکر است مصرف سرانه‌ی نان در ایران ۴۳۰ گرم در روز، چندین برابر بیش از مقادیر غلات صبحانه‌ای (۱۰۰-۵۰ گرم) در نظر گرفته شده در مطالعه‌ی Villa و Markaki (۱۵) است و از آن جایی که دز مرجع مورد استفاده در آن مطالعه به عنوان یکی از شاخص‌های مرجع در مطالعه‌ی حاضر نیز استفاده شد، محاسبه‌ی احتمال خطر بالاتر در مطالعه‌ی حاضر به طور کامل قابل توجیه است. این موضوع نشان دهنده‌ی اثر کوچک بودن میزان قابل تحمل این سم در این گونه

مطالعات ارزیابی خطر آن است. از طرفی، این شاخص بین سایر مقادیر اعلام شده توسط سایر سازمان‌ها نیز بالاترین مقدار است.

در یک مطالعه‌ی مروری، Andrade و Caldas خطر دریافت چند نوع آفلاتوکسین شامل AFB1، AFB2، AFG1 و AFG2، از طریق مصرف چندین نوع غله شامل ذرت، برنج، سورگوم و گندم در سراسر جهان را با استفاده از داده‌های منتشر شده ارزیابی کردند. آن‌ها در مطالعه‌ی خود برای تخمین مقادیر دریافت آفلاتوکسین از اطلاعات به دست آمده از ۱۷ خوشه‌ی رژیم غذایی استفاده نمودند. بر اساس نتایج مطالعه‌ی آن‌ها، نقش برنج، گندم، ذرت و سورگوم در دریافت کلی آفلاتوکسین به ترتیب، ۴۱/۶، ۳۵/۴، ۲۱/۲ و ۱۸/۰ درصد ارزیابی گردید. ضریب خطر در این مطالعه، بسته به رژیم غذایی از ۵۶-۱۰ متفاوت بود که نشان دهنده‌ی خطر بالقوه برای مصرف کنندگان است و برآورد خطر سرطان‌زایی در محدوده‌ی متفاوتی از ۰/۴۶۷-۰/۰۵۷ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش گردید (۲۱). در این مطالعه نسبت به مطالعه‌ی حاضر، برای محاسبه‌ی خطر سرطان‌زایی از شاخص ۰/۰۱ نانوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر استفاده شد. در روش پیش‌گفته، از نسبت دادن میزان مواجهه با سم به عدد ۰/۰۱ با واحد یکسان، عدد بدون واحدی به دست می‌آید که نشان دهنده‌ی تعداد افزوده‌ی افرادی است که در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بر اثر این مواجهه مستعد سرطان خواهند شد و اگر این نسبت به ۱ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر برسد، خطر جدی از این طریق جامعه را تهدید خواهد کرد. با اتخاذ این روش محاسبه در مطالعه‌ی حاضر، این عدد ۰/۱۵ به دست آمد که در محدوده‌ی ذکر شده در مطالعه‌ی Andrade و Caldas است و شرایط ایمن‌تری را نسبت به روش مقایسه‌ی خطر در مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد.

باید توجه داشت که عدم هماهنگی در دز مرجع اعلام شده برای این سموم، از چالش‌های اساسی برای ارزیابی خطر دریافت آن است. با توجه به حدود مجاز تعیین شده حتی در اتحادیه‌ی اروپایی که قوانین سخت‌گیرانه‌تری نسبت به سایر نقاط دنیا برای حدود مجاز در غذا تدوین شده است، آلودگی ماده غذایی مثل نان که تأمین کننده‌ی حدود نیمی از انرژی در رژیم غذایی انسان است، به بالاترین حدود مجاز موجب دریافت چندین برابر از حدود قابل تحمل این سم می‌گردد.

این مطالعه، با محدودیت‌هایی از قبیل کمبود مطالعات مشابه در زمینه‌ی ارزیابی خطر در سطح ملی، همگن نبودن مطالعات خارجی برای تعیین دز مرجع به عنوان TDI و شاخص سرطان‌زایی آفلاتوکسین روبه‌رو بود.

می‌توان از این مطالعه چنین نتیجه‌گیری کرد که اغلب نمونه‌ها از نظر حضور آفلاتوکسین مثبت تلقی می‌شوند و در هیچ یک از نمونه‌ها میزان آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۱۵ قسمت در بیلیون) نبود (جدول ۱)، اما بالاتر بودن ضریب خطر برآورد شده از دریافت آفلاتوکسین در نان، نسبت به حدود قابل تحمل برای بدن و بالاتر بودن خطر سرطان‌زایی آفلاتوکسین دریافت شده از حدود پایه، نشان دهنده‌ی لزوم کاهش سرانه‌ی مصرف نان در رژیم غذایی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد سمیرا شکری جوکار به شماره‌ی طرح ۳۹۴۰۰۷ مصوب دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان استخراج شد. بدین وسیله نویسندگان از مرکز تحقیقات امنیت غذایی جهت حمایت مالی و تمامی عزیزانی که در این پژوهش ما را یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Majzoobi M, Pashangeh S, Farahnaky A, Eskandari MH, Jamalian J. Effect of particle size reduction, hydrothermal and fermentation treatments on phytic acid content and some physicochemical properties of wheat bran. J Food Sci Technol 2014; 51(10): 2755-61.
2. Mosharraf L, Kadivar M, Shahedi M. Effect of hydrothermaled bran on physicochemical, rheological and microstructural characteristics of Sangak bread. J Cereal Sci 2009; 49(3): 398-404.
3. Babashahi M, Mirlohi M, Ghiasvand R, Azadbakht L. Comparison of soymilk and probiotic soymilk effects on serum high-density lipoprotein cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol in diabetic Wistar rats. ARYA Atheroscler 2015; 11(Suppl 1): 88-93.
4. Karami F, Omrani GhA, Shoeibi Sh, Tabraee B, Rahimifard N, Arjomandi R. Survay of fungal contamination of bread wastes recycled in the regions 6 and 7 of Tehran Municipality. Iran J Med Microbiol 2012; 6(3): 52-8. [In Persian].
5. Doaee A. The study of factors affect the quality of bread. Tehran, Iran: Ministry of Agriculture, Agricultural Planning, Economic and Rural Development Research Institute; 2008. p. 85. [In Persian].
6. Mahmoudi M, Aryaee P, Ghanbari M, Ansari H, Nourafcan H. The determination of aflatoxin and ochratoxin of flour and wheat in northern Iran. Proceedings of the International Conference on Environment, Agriculture and Food Sciences; 2012 Aug 11-12; Phuket, Thailand.
7. Taheri N, Semnani S, Roshandel G, Namjoo M, Keshavarzian H, Chogan A, et al. Aflatoxin contamination in wheat flour samples from Golestan Province, northeast of Iran. Iran J Public Health

2012; 41(9): 42-7.
8. Behfar A, Khorasgani ZN, Mosavi A. Determination of aflatoxin (B1, B2, G 1, G2) levels in wheat flour. Toxicology Letters 2008; 180(Suppl): S179.
9. Kouhian K, Kazemi MH, Akbari M, Soleiman Meigooni S, Esavand A. Survay the level of aflatoxin B1 and M1 in a number of nutrients in food ware house of NEZAJA units in Tehran in 2010. Nurse and Physician Within War 2012; (15-16): 16-18. [In Persian].
10. Mohammad Hasani F, Mirlohi M, Mosharraf L. Occurrence of aflatoxin in wheat flour specified for Sangak bread and its reduction through fermentation and baking practices. 2015. [Under Publication].
11. Rahimi E, Erfani M, Shakerian A. Frequency of ochratoxin A in bread consumed in Shahrekord. J Shahrekord Univ Med Sci 2014; 16(2): 63-9. [In Persian].
12. Wang Y, Sheng D, Wang D, Yang X, Wu J. Non-carcinogenic baseline risk assessment of heavy metals in the Taihu Lake Basin, China. Hum Ecol Risk Assess 2011; 17(1): 212-8.
13. Li Y, Liu J, Cao Z, Lin C, Yang Z. Spatial distribution and health risk of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water of the Luanhe River Basin, China. Environ Monit Assess 2010; 163(1-4): 1-13.
14. Sekiyama BL, Ribeiro AB, Machinski PA, Machinski Junior M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. Braz J Microbiol 2005; 36: 289-94.
15. Villa P, Markaki P. Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: Occurrence and risk assessment. Food Control 2009; 20(5): 455-61.
16. Hedayati MT, Mohammadpour RA. The contamination rate of stored wheat samples of mazandaran province by aspergillus flavous and aflatoxin (2003). Behbood J 2005; 9(1): 52-61. [In Persian].
17. Vidal A, Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. Food Chem Toxicol 2013; 53: 133-8.
18. Bento JMV, Pena A, Lino CM, Pereira JA. Determination of ochratoxin A content in wheat bread samples collected from the Algarve and Braganca regions, Portugal: Winter 2007. Microchem J 2009; 91(2): 165-9.
19. Zinedine A, Juan C, Idrissi L, Maes J. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. Microchem J 2007; 87(2): 154-8.
20. Sugita-Konishi Y, Park BJ, Kobayashi-Hattori K, Tanaka T, Chonan T, Yoshikawa K, et al. Effect of cooking process on the deoxynivalenol content and its subsequent cytotoxicity in wheat products. Biosci Biotechnol Biochem 2006; 70(7): 1764-8.
21. Andrade PD, Caldas ED. Aflatoxins in cereals: worldwide occurrence and dietary risk assessment. World Mycotoxin 2015; 8(4): 415-31.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 14.10.2015
Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016
Accepted: 17.01.2016

Flour and Bread Aflatoxin Contamination and Risk Assessment of Aflatoxin Intake through Bread Consumption in Iran

Samira Shokri-Jokari[1], Maryam Mirlohi PhD[2], Laleh Mosharraf PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: In recent years, limited information has been provided regarding the occurrence of aflatoxins in flour samples and in traditional flat breads in comparison to the leavened breads in Iran. In this study, aflatoxin contamination in some bakery products and assessment of risk of aflatoxin intake were investigated.

Methods: In this experimental cross-sectional study, 66 samples including 29 different flour samples, 14 traditional flat bread samples, 10 leavened bread samples, and 13 samples of sesame and seeds used for dressing breads were randomly collected from different factories and bakeries in Isfahan, Iran, and examined for aflatoxin residue using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific kit. The risk of aflatoxin intake for consumers was assessed using hazard quotient and mean and data analysis was conducted using one-way ANOVA and Fisher's least significant difference (LSD).

Findings: Aflatoxin residue was found in all of the studied samples in the range of 0.5 to 6.54 pbb and did not exceed the national standard level (15 pbb). Traditional flat breads contained two times more aflatoxin than leavened breads. Hazard quotient ranged from 5.4 to 101 and the relative carcinogenic risk was higher than 10^{-4}.

Conclusion: Despite the low aflatoxin contamination levels in bread in this study, the hazard index of higher than the tolerable limit for humans showed that reduction of daily bread consumption in Iran is critical.

Keywords: Aflatoxin, Bread, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Flour, Risk assessment

Citation: Shokri Jokari S, Mirlohi M, Mosharraf L. **Flour and Bread Aflatoxin Contamination and Risk Assessment of Aflatoxin Intake through Bread Consumption in Iran.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2420-8

1- MSc Student, Food Security Research Center AND Department of Food Safety and Hygiene, School of Nutrition and Food Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Food Security Research Center AND Department of Food Technology, School of Nutrition and Food Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering Research, Isfahan Agricultural and Natural Resources Education and Research Center, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Maryam Mirlohi PhD, Email: m_mirlohi@hlth.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱

ارتباط میان چاقی با یبوست و یبوست عملکردی در بزرگسالان ایرانی

نجمه سالک[۱]، عادله دادخواه[۱]، پروانه صانعی[۲]، دکتر عمار حسن‌زاده کشتلی[۳]، دکتر احمد اسماعیل‌زاده[۴]، دکتر پیمان ادیبی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یبوست، یک اختلال شایع در دستگاه گوارش است که بر کیفیت زندگی بیمار اثر می‌گذارد. یافته‌های حاصل از مطالعات انجام شده در رابطه با چاقی و یبوست، ضد و نقیض هستند. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی ارتباط میان چاقی عمومی و چاقی شکمی با یبوست و یبوست عملکردی در گروه بزرگی از جمعیت بزرگسال ایرانی بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مقطعی انجام شده روی ۴۴۵۷ بزرگسال، با استفاده از اندازه‌های تن‌سنجی برگرفته از پرسش‌نامه‌ی خود- اجرا، افراد بر اساس شاخص توده‌ی بدنی به سه دسته افراد با وزن طبیعی، افراد با اضافه وزن و افراد چاق و بر اساس دور کمر به سه دسته‌ی طبیعی، دارای اضافه وزن شکمی و افراد با چاقی شکمی، طبقه‌بندی شدند. شیوع یبوست و یبوست عملکردی و اجزای آن با توجه به معیارهای ROME III مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: شیوع یبوست و یبوست عملکردی در بین افراد مورد مطالعه به ترتیب ۳۳/۶ و ۱۵/۳ درصد بود. پس از تعدیل عوامل مخدوش‌گر، افراد چاق نسبت به افراد با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی، ۳۲ درصد بیشتر در معرض خطر ابتلا به یبوست بودند (OR = ۱/۳۲ یا Odd ratio؛ ۹۵ درصد CI: ۱/۰۳-۱/۷۱). ارتباط معنی‌داری بین چاقی با خطر ابتلا به یبوست عملکردی یافت نشد. زمانی که آنالیزها به تفکیک جنس صورت گرفت، ارتباط معنی‌داری بین اضافه وزن و چاقی در مدل خام با خطر ابتلا به یبوست در زنان مشاهده شد؛ به طوری که زنان دارای اضافه وزن، نسبت به زنان با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی، ۲۱ درصد (۹۵ درصد CI: ۱/۰۲-۱/۴۵؛ OR = ۱/۲۱) و زنان چاق نسبت به زنان با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی ۶۵ درصد (۹۵ درصد CI: ۱/۲۶-۲/۱۵؛ OR = ۱/۶۵) خطر بیشتری برای ابتلا به یبوست داشتند. بررسی ارتباط چاقی شکمی با یبوست و یبوست عملکردی در کل افراد مورد مطالعه، حاکی از وجود ارتباط‌های معنی‌دار بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی در مدل خام بود، اما تعدیل برای عوامل مخدوش‌گر، باعث از بین رفتن این ارتباط‌ها گردید. آنالیزها به تفکیک جنس در مدل‌های تعدیل شده، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی در مردان یا زنان نشان نداد.

نتیجه‌گیری: چاقی عمومی با افزایش معنی‌دار خطر یبوست در این جمعیت مرتبط بود؛ در حالی که چاقی شکمی ارتباطی با یبوست و یبوست عملکردی نداشت. چاقی عمومی در زنان با افزایش معنی‌دار خطر یبوست همراه بود؛ در حالی که در مردان هیچ ارتباط معنی‌داری بین چاقی یا چاقی شکمی با یبوست و یبوست عملکردی مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: یبوست، یبوست عملکردی، شاخص توده‌ی بدنی، چاقی عمومی، چاقی شکمی

ارجاع: سالک نجمه، دادخواه عادله، صانعی پروانه، حسن‌زاده کشتلی عمار، اسماعیل‌زاده احمد، ادیبی پیمان. **ارتباط میان چاقی با یبوست و یبوست عملکردی در بزرگسالان ایرانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۳۹-۲۴۲۹

مقدمه

یبوست، یک اختلال شایع در دستگاه گوارش با شیوع حدود ۲۸-۲ درصد می باشد (۴-۱) که باعث دفع مدفوع دشوار، ناقص و با تعداد دفعات کم می گردد (۵). یبوست به علت عوارض آن، اثر بر شیوه‌ی زندگی و کیفیت زندگی بیمار، از دست رفتن کارایی فرد و هزینه های مشاوره‌ی پزشکی، یک معضل مهم بهداشت عمومی تلقی

۱- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی و گروه علوم تغذیه، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات کاربردی گوارش، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استاد، مرکز تحقیقات امنیت غذایی و گروه تغذیه‌ی جامعه، دانشکده‌ی تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- استاد، مرکز تحقیقات کاربردی گوارش، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر پیمان ادیبی
Email: adibi@med.mui.ac.ir

می‌گردد (۷-۶). در ایالات متحده‌ی امریکا، ۶/۹ میلیارد دلار در سال صرف داروهای مربوط به یبوست می‌شود (۱). در ایران نیز هزینه‌های سالانه‌ی یبوست برای جمعیت شهری حدود ۸۹/۲ میلیون دلار برآورد شده است (۸). عوامل محیطی مختلفی از جمله رژیم غذایی (۱۵-۳)، سیگار کشیدن، مصرف الکل (۹، ۳) و مصرف برخی داروها (۴) بر خطر ابتلا به یبوست مؤثر هستند. چاقی نیز از جمله عواملی است که با یبوست در ارتباط می‌باشد (۱۵، ۹، ۳). با این حال، یافته‌های مطالعات انجام شده در رابطه با چاقی و یبوست، ضد و نقیض هستند (۱۷-۱۶، ۳).

گرچه مطالعات متعددی ارتباط مثبت و معنی‌داری بین چاقی و یبوست یافته‌اند، اما بسیاری دیگر در رسیدن به این رابطه ناموفق بوده‌اند (۱۷-۱۶، ۳). در یک مطالعه در میان بزرگسالان برزیل، ارتباط معنی‌داری بین افزایش وزن و یبوست پیدا نشد (۱۶). با این حال، دو مطالعه‌ی دیگر در ایتالیا و ایران رابطه‌ی مثبت بین چاقی و یبوست در بزرگسالان را تأیید کرده‌اند (۱۷، ۳). چاقی ممکن است از طریق تغییرات هورمونی (۱۸) و اختلالات حسی و حرکتی بر یبوست اثر گذار باشد. در واقع، چاقی با افزایش ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی و افزایش التهاب، به نوبه‌ی خود باعث اختلال حرکتی (۱۹) و تغییر در حرکات لوله‌ی گوارش می‌گردد. اغلب مطالعاتی که به بررسی ارتباط بین چاقی و یبوست پرداخته‌اند، در کشورهای غربی انجام شده و اطلاعات محدودی در این زمینه از کشورهای در حال توسعه به ویژه کشورهای خاورمیانه در دست می‌باشد.

بررسی ارتباط چاقی و یبوست به ویژه برای جمعیت خاورمیانه، به دلیل شیوع بالای نوع خاصی از چاقی که در اصطلاح به آن «الگوی چاقی خاورمیانه» گفته می‌شود (۲۰)، موضوعی مهم است. به علاوه، در مطالعات قبلی در این منطقه، اثر عوامل مخدوش‌گر برای رسیدن به یک ارتباط مستقل در نظر گرفته نشده است. همچنین، اکثر مطالعات قبلی بر روی چاقی عمومی تمرکز داشته اند و اطلاعات در مورد ارتباط بین چاقی شکمی و یبوست محدود می‌باشد که این امر، برای جمعیت خاورمیانه با توجه به شیوع بالای چاقی شکمی در این منطقه، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همچنین، اندازه‌ی نمونه‌ی مورد مطالعه در اغلب تحقیقات قبلی محدود بوده است. بنا بر این، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی ارتباط بین چاقی عمومی و شکمی با یبوست و یبوست عملکردی در گروه بزرگی از جمعیت بزرگسال ایرانی به انجام رسید.

روش‌ها

شرکت کنندگان: این مطالعه‌ی مقطعی، در چارچوب طرح سپاهان (SEPAHAN) در استان اصفهان انجام شد. این طرح، به منظور بررسی اپیدمیولوژی اختلالات گوارشی عملکردی و نقش شیوه‌ی زندگی و عوامل تغذیه‌ای و روانی در این اختلالات در دو مرحله‌ی جداگانه صورت گرفت. در مرحله‌ی اول، پرسش‌نامه‌ای در اختیار شرکت کنندگان در طرح قرار گرفت تا اطلاعات مربوط به عوامل اجتماعی و جمعیت شناختی، داده‌های تن‌سنجی و عادات غذایی جمع‌آوری گردد. در مرحله‌ی دوم، پرسش‌نامه‌های دیگری برای ارزیابی سلامت دستگاه گوارش و روان برای افراد ارسال شد. در مرحله‌ی اول و دوم طرح، به ترتیب ۸۶۹۱ (با میزان پاسخ‌دهی ۸۶/۱۶ درصد) و ۶۲۳۹ نفر (با میزان پاسخ‌دهی ۶۴/۶۴ درصد) پرسش‌نامه‌های تکمیل شده را بازگرداندند. پس از تلفیق اطلاعات پرسش‌نامه‌های هر دو مرحله، اطلاعات کامل از ۴۴۵۷ نفر برای چاقی عمومی و ۳۶۰۳ نفر برای چاقی شکمی حاصل شد. رضایت‌نامه‌ی آگاهانه از تمامی شرکت کنندگان اخذ شد و مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق تحقیقات پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسید.

ارزیابی‌های تن‌سنجی: اطلاعات مربوط به قد، وزن و دور کمر با استفاده از پرسش‌نامه‌ی خود- اجرا جمع‌آوری شد. سپس شاخص توده‌ی بدن (Body mass index یا BMI) به صورت وزن (بر حسب کیلوگرم) تقسیم بر مجذور قد (بر حسب مترمربع) محاسبه گردید.

شرکت کنندگان بر اساس شاخص توده‌ی بدنی (کیلوگرم بر مترمربع) به سه دسته‌ی دارای وزن طبیعی (BMI ≤ ۲۵ کیلوگرم بر مترمربع)، دچار اضافه وزن (۲۹/۹ کیلوگرم بر مترمربع > BMI > ۲۵/۰ کیلوگرم بر مترمربع) و چاق (BMI ≤ ۳۰ کیلوگرم بر مترمربع) طبقه‌بندی شدند. چاقی شکمی بر اساس اندازه‌ی دور کمر تعریف شد. اضافه وزن و چاقی شکمی، به ترتیب بر اساس معیارهای پیشنهاد شده توسط Lean و همکاران و برنامه‌ی آموزش ملی کلسترول (National cholesterol education program یا NCEP) تعریف شدند (۲۱). شرکت کنندگان بر اساس دور کمر (سانتی‌متر) نیز به سه دسته‌ی دارای دور کمر طبیعی (< ۸۰ سانتی‌متر برای زنان، < ۹۴ سانتی‌متر برای مردان)، دچار اضافه وزن شکمی (۸۸-۸۰ سانتی‌متر برای زنان، ۱۰۲-۹۴ سانتی‌متر برای مردان)، دارای چاقی شکمی (≤ ۸۸ سانتی‌متر برای زنان، ≤ ۱۰۲ سانتی‌متر برای مردان) تقسیم شدند.

اعتبار داده‌های خود گزارش‌دهی شده‌ی وزن، قد و دور کمر با یک مطالعه‌ی پایلوت بر روی ۲۰۰ شرکت کننده از همین جمعیت مورد بررسی قرار گرفت (۲۲). مقادیر خود گزارش‌دهی شده از شاخص‌های تن‌سنجی، با مقادیر اندازه‌گیری شده مقایسه شد. ضرایب همبستگی برای مقادیر خود گزارش‌دهی شده‌ی وزن، قد و دور کمر در مقابل مقادیر اندازه‌گیری شده به ترتیب ۰/۹۵ (P < ۰/۰۰۱)، ۰/۸۳ (P < ۰/۰۰۱) و ۰/۶۰ (P < ۰/۰۰۱) بود. ضریب همبستگی برای

شاخص توده‌ی بدنی محاسبه شده با استفاده از مقادیر خود گزارش شده و مقادیر اندازه‌گیری شده، ۰/۷۰ (P < ۰/۰۰۱) بود (۲۲). این یافته‌ها نشان می‌داد که مقادیر خود گزارش شده، ارایه دهنده‌ی اطلاعات مناسب و قابل قبولی برای شاخص‌های تن‌سنجی مورد نظر می‌باشند.

ارزیابی یبوست عملکردی: برای جمع‌آوری اطلاعات مربوط به سلامت دستگاه گوارش، از پرسش‌نامه‌ی استاندارد اعتبارسنجی شده‌ی Rome III استفاده شد. این پرسش‌نامه، از علایم بالینی به منظور طبقه‌بندی اختلالات عملکردی گوارش استفاده می‌کند. ابتدا این پرسش‌نامه از زبان اصلی (انگلیسی) به فارسی برگردانده شد. بر اساس تعریف عملی، فردی مبتلا به یبوست عملکردی در نظر گفته شد که در سه ماه گذشته سه معیار زیر را داشت: ۱) داشتن دو یا بیشتر از علایم زیر: تعداد دفعات اجابت مزاج کمتر از سه بار در هفته، مدفوع خیلی سفت یا شبیه پشکل، زور زدن هنگام دفع مدفوع، احساس عدم تخلیه‌ی روده‌ها به طور کامل بعد از دفع مدفوع، احساس توقف مدفوع در روده، تسهیل دفع مدفوع با استفاده از انگشت یا شیلنگ دستشویی برای دفع. ۲) نداشتن مدفوع شل و آبکی ۳) عدم وجود معیارهای سندرم روده‌ی تحریک پذیر در فرد بر اساس پرسش‌نامه‌ی Rome III.

ارزیابی سایر متغیرها: اطلاعات تکمیلی در مورد سن، جنس، تحصیلات، وضعیت تأهل، عادات سیگار کشیدن و سابقه‌ی دیابت، با استفاده از پرسش‌نامه به دست آمد. همچنین، یک سری از عادات غذایی شامل خوب جویدن (افرادی که غذا را متوسط یا زیاد می‌جوند)، وعده‌های غذایی منظم (افرادی که اغلب یا همیشه منظم غذا مصرف می‌کنند)، غذا خوردن سریع (≤ ۱۰ دقیقه برای هر یک از سه وعده‌ی غذایی)، نخوردن صبحانه (افرادی که کمتر از ۵ بار در هفته صبحانه می‌خورند)، تعداد وعده‌های غذایی (وعده‌ی غذایی اصلی در روز)، مصرف مایعات (لیوان در روز)، مصرف غذاهای سرخ کردنی (تعداد دفعات در هفته) نیز با استفاده از پرسش‌نامه مورد بررسی قرار گرفت. پرسش‌نامه‌ی فعالیت فیزیکی General Practice Physical Activity Questionnaire یا GPPAQ) برای ارزیابی سطح فعالیت فیزیکی افراد مورد مطالعه استفاده گردید. این پرسش‌نامه، یک ابزار غربال‌گری ساده‌ی اعتبارسنجی شده که برای رتبه‌بندی افراد بر اساس فعالیت فیزیکی است که بر فعالیت فیزیکی معمول افراد در ساعات کار و اوقات فراغت تمرکز دارد. از افراد مورد مطالعه درخواست شد که فعالیت‌های خود را بر اساس سؤال‌های GPPAQ گزارش کنند. در آنالیزها، افراد از نظر فعالیت فیزیکی به دو گروه فعال و نسبتا فعال (فعالیت فیزیکی ۱ ساعت/هفته یا بیشتر) و نسبتا غیر فعال و غیر فعال (فعالیت فیزیکی کمتر از ۱ ساعت/هفته) طبقه‌بندی شدند.

روش‌های آماری: مقایسه‌ی متغیرهای پیوسته در گروه‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر با استفاده از آزمون One-way ANOVA انجام شد. برای بررسی توزیع افراد در سطوح مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر، از آزمون χ^2 استفاده شد. ارتباط دور کمر و شاخص توده‌ی بدنی با یبوست و یبوست عملکردی با استفاده از رگرسیون لجستیک در دو مدل ارزیابی شد. در ابتدا، ارتباط در مدل خام بررسی شد. سپس در مدل تعدیل شده، اثر سن (پیوسته)، جنس (مرد، زن)، فعالیت فیزیکی (≤ ۱ ساعت در هفته، > ۱ ساعت در هفته)، سیگار کشیدن (مصرف کننده‌ی سیگار، مصرف کننده‌ی سیگار در گذشته، غیر مصرف کننده‌ی سیگار)، تعداد وعده‌های غذایی (کمی)، نظم وعده‌های غذایی (منظم، نامنظم)، کیفیت جویدن (غیر خوب، خوب)، سرعت خوردن ناهار (آرام، سریع یا در طی کمتر از ۱۰ دقیقه)، سرعت خوردن شام (آرام، سریع یا در طی کمتر از ۱۰ دقیقه)، مصرف وعده‌ی صبحانه (همیشه، صرف نظر کننده از صبحانه یا ≤ ۴ بار در هفته)، مصرف مایعات (کمی)، مصرف غذای سرخ کرده (کیفی) در نظر گرفته شد. رابطه‌ی بین شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر و یبوست یا اجزای متشکله‌ی یبوست عملکردی، فقط در مدل تعدیل شده ارایه شد. در همه‌ی این آنالیزها، افراد با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی (< ۲۵ کیلوگرم بر مترمربع) و دور کمر طبیعی (< ۸۰ سانتی‌متر برای زنان، < ۹۴ سانتی‌متر برای مردان) به عنوان گروه مبنا در نظر گرفته شدند. تمامی آنالیزها برای یبوست، یبوست عملکردی و اجزای آن به صورت مجزا انجام شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) برای تمامی آنالیزها استفاده شد و P < ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات عمومی افراد مورد مطالعه در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر در جدول ۱ آمده است. افراد چاق، نسبت به افراد طبیعی سن و وزن بالاتری داشتند و درصد بیشتری از آن‌ها را افراد متأهل و مردان تشکیل می‌دادند. شیوع دیابت در بین افراد چاق نسبت به افراد با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی، به طور معنی‌داری بیشتر بود. افراد مبتلا به چاقی شکمی نسبت به افراد با دور کمر طبیعی، از سن، وزن و شاخص توده‌ی بدنی بالاتری برخوردار بودند و درصد بیشتری از آن‌ها را زنان و متأهلین تشکیل می‌دادند. شیوع استعمال دخانیات و دیابت در بین آن‌ها بیشتر از افراد با دور کمر طبیعی بود و درصد کمتری از آن‌ها، نسبت به افراد با دور کمر طبیعی، از فعالیت بدنی یک ساعت یا بیشتر در هفته برخوردار بودند. شیوع مصرف سیگار و دیابت در میان افراد با چاقی شکمی، بیشتر از افراد با دور کمر طبیعی بود.

جدول ۱. مشخصات عمومی افراد مورد مطالعه در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر[۱]

پارامترها	شاخص توده‌ی بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)			مقدار P[۳]	دور کمر			مقدار P[۳]
	< ۲۵ (n = ۲۳۷۷)	۲۵-۲۹/۹ (n = ۱۶۴۸)	≥ ۳۰ (n = ۴۳۲)		طبیعی (n = ۱۵۵۱)	اضافه وزن شکمی (n = ۱۰۱۳)	چاقی شکمی (n = ۱۰۳۹)	
سن (سال)	۳۴/۳ ± ۷/۸	۳۸/۴ ± ۷/۴	۳۹/۹ ± ۷/۸	< ۰/۰۰۱	۳۴/۷ ± ۷/۹	۳۷/۱ ± ۷/۵	۳۸/۶ ± ۷/۲	< ۰/۰۰۱
وزن (کیلوگرم)	۶۱/۰ ± ۸/۸	۷۵/۳ ± ۹/۲	۸۷/۱ ± ۱۶/۷	< ۰/۰۰۱	۶۴/۰ ± ۱۲/۱	۷۰/۱ ± ۱۳/۲	۷۴/۶ ± ۱۲/۱	< ۰/۰۰۱
شاخص توده‌ی بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۲/۱ ± ۲/۰	۲۷/۰ ± ۱/۳	۳۳/۸ ± ۷/۲	< ۰/۰۰۱	۲۲/۹ ± ۴/۱	۲۵/۴ ± ۳/۸	۲۸/۱ ± ۴/۳	< ۰/۰۰۱
زن (درصد)	۶۲	۴۹	۵۹	< ۰/۰۰۱	۴۳	۶۰	۷۸	< ۰/۰۰۱
متأهل (درصد)	۹۰	۹۱	۷۳	< ۰/۰۰۱	۷۴	۸۶	۹۰	< ۰/۰۰۱
تحصیلات دانشگاهی (درصد)	۶۲	۵۴	۴۸	< ۰/۰۰۱	۵۸	۶۰	۵۳	۰/۰۰۴
سیگاری (درصد)	۱۴	۱۵	۱۶	۰/۰۷۰	۱۳	۱۳	۱۶	۰/۰۴۰
مبتلا به دیابت (درصد)	۱	۲	۴	< ۰/۰۰۱	۱	۲	۳	۰/۰۰۱
از نظر فیزیکی فعال[۲] (درصد)	۶۵	۶۶	۶۱	۰/۲۱۰	۶۹	۶۳	۵۹	< ۰/۰۰۱

۱. تمام مقادیر میانگین ± انحراف معیار هستند، به جز موارد مشخص شده؛ ۲. داشتن فعالیت بدنی ≤ ۱ ساعت در هفته؛ ۳. مقدار P به دست آمده از One-way ANOVA برای متغیرهای پیوسته و آزمون χ^2 برای متغیرهای گسسته

توزیع افراد از نظر رفتارهای مرتبط با تغذیه یا عادات غذایی در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر در جدول ۲ آمده است. درصد کمتری از افراد چاق، نسبت به افراد با وزن طبیعی، وعده‌های غذایی منظمی داشتند و غذای خود را خوب می‌جویدند. شیوع سریع خوردن شام در بین افراد چاق، کمتر از افراد طبیعی بود. درصد بیشتری از افراد چاق، نسبت به افراد با وزن طبیعی، ناهار خود را سریع‌تر میل می‌کردند. از نظر سایر رفتارهای مرتبط با تغذیه، تفاوت آماری معنی‌داری در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی وجود نداشت. توزیع افراد از نظر تعداد وعده‌های غذایی مصرفی در روز در بین رده‌های مختلف دور کمر تفاوت معنی‌داری داشت؛ به طوری که درصد کمتری از افراد مبتلا به چاقی شکمی، روزانه سه وعده‌ی غذایی اصلی را مصرف می‌کردند.

همچنین، در مقایسه با افراد با دور کمر طبیعی، درصد کمتری از افراد مبتلا به چاقی شکمی وعده‌های غذایی منظم داشتند، غذای خود را خوب می‌جویدند، شام خود را سریع‌تر می‌خوردند و درصد بیشتری از آن‌ها صبحانه‌ی خود را حذف و ناهار خود را با سرعت بیشتری میل می‌کردند. توزیع افراد مورد مطالعه از نظر تکرر مصرف غذاهای سرخ کردنی در هفته در بین رده‌های مختلف دور کمر نیز تفاوت آماری معنی‌داری داشت.

شیوع یبوست و یبوست عملکردی در بین افراد مورد مطالعه، به ترتیب ۳۳/۶ و ۱۵/۳ درصد بود. نسبت شانس ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر در جدول ۳ آمده است. پس از تعدیل عوامل مخدوش‌گر، افراد چاق، نسبت به افراد با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی، از ۳۲ درصد شانس بیشتری برای ابتلا به یبوست برخوردار بودند (OR = ۱/۳۲ یا Odd ratio؛ ۹۵ CI: ۱/۰۳-۱/۷۱ درصد)؛ در حالی که در کل افراد مورد بررسی، ارتباط معنی داری بین چاقی با خطر ابتلا به یبوست عملکردی چه در مدل خام و چه در مدل تعدیل شده مشاهده نشد.

زمانی که آنالیزها به تفکیک جنس صورت گرفت، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین چاقی و خطر ابتلا به یبوست در مردان مشاهده نشد، اما در زنان، ارتباط معنی داری بین اضافه وزن و چاقی در مدل خام با خطر ابتلا به یبوست مشاهده شد؛ به طوری که زنان دارای اضافه وزن نسبت به زنان با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی ۲۱ درصد (OR = ۱/۲۱؛ ۹۵ CI: ۱/۰۲-۱/۴۵ درصد) و زنان چاق نسبت به زنان با شاخص توده‌ی بدنی طبیعی ۶۵ درصد (OR = ۱/۶۵؛ ۹۵ CI: ۱/۲۶-۲/۱۵ درصد) شانس بیشتری را برای ابتلا به یبوست داشتند. تعدیل برای عوامل مخدوش‌گر، باعث از بین رفتن ارتباط بین اضافه وزن با خطر ابتلا به یبوست گردید، اما همچنان ارتباط معنی‌داری بین چاقی با خطر ابتلا به یبوست وجود داشت.

در مورد یبوست عملکردی در زنان، هر چند ارتباط معنی‌داری با چاقی مشاهده نشد، اما با افزایش شاخص توده‌ی بدنی، تمایل به افزایش خطر یبوست عملکردی در زنان واضح بود. بررسی ارتباط چاقی شکمی با یبوست و یبوست عملکردی در کل افراد مورد مطالعه، حاکی از وجود ارتباط‌های معنی‌دار بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی در مدل خام بود، اما تعدیل برای عوامل مخدوش‌گر، باعث از بین رفتن این ارتباط‌ها گردید.

جدول ۲. توزیع افراد از نظر رفتارهای مرتبط با تغذیه در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر[۱]

	شاخص توده‌ی بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)			مقدار P[۶]	دور کمر			مقدار P[۶]
	< ۲۵ (n = ۲۳۷۷)	۲۵-۲۹/۹ (n = ۱۶۴۸)	≥ ۳۰ (n = ۴۳۲)		طبیعی (n = ۱۵۵۱)	اضافه وزن شکمی (n = ۱۰۱۳)	چاقی شکمی (n = ۱۰۳۹)	
تعداد وعده‌های غذایی (وعده‌ی اصلی/روز)				۰/۱۷۰				۰/۰۲۰
۱	۳	۴	۴		۳	۴	۴	
۲	۲۴	۲۷	۲۷		۲۴	۲۷	۲۸	
۳	۷۱	۶۶	۶۷		۷۲	۶۸	۶۵	
نظم وعده‌های غذایی[۲]	۶۰	۶۰	۵۰	< ۰/۰۰۱	۶۲	۶۱	۵۶	۰/۰۰۵
خوب جویدن[۳]	۸۹	۸۴	۷۶	< ۰/۰۰۱	۹۰	۸۳	۸۱	< ۰/۰۰۱
خوردن سریع ناهار[۴]	۱۳	۱۷	۱۸	< ۰/۰۰۱	۱۲	۱۶	۱۸	۰/۰۰۱
خوردن سریع شام[۴]	۸۰	۷۶	۷۰	< ۰/۰۰۱	۷۹	۷۷	۷۴	۰/۰۱۰
خوردن صبحانه[۵]	۲۲	۲۲	۲۶	۰/۱۴۰	۲۱	۲۰	۲۴	۰/۰۴۰
مصرف نوشیدنی (لیوان/روز)				۰/۱۳۰				۰/۲۹۰
< ۲	۲۵	۲۳	۲۶		۲۳	۲۷	۲۷	
۲-۵	۵۳	۵۱	۴۹		۵۲	۵۲	۵۰	
۶-۸	۱۶	۱۹	۱۸		۱۸	۱۶	۱۷	
> ۸	۴	۵	۶		۵	۴	۴	
مصرف مواد غذایی سرخ شده (دفعات در هفته)				۰/۰۹۰				۰/۰۲۰
هرگز	۱۱	۱۲	۱۲		۱۰	۱۳	۱۳	
۱-۳	۶۸	۷۰	۷۰		۶۹	۶۹	۶۸	
۴-۶	۱۵	۱۲	۱۲		۱۶	۱۲	۱۲	
هر روز	۲	۳	۲		۹	۳	۳	

۱. تمام مقادیر درصد هستند؛ ۲. کسانی که برای مصرف وعده‌های غذایی به طور منظم «اغلب» یا «همیشه» را پاسخ داده‌اند؛ ۳. کسانی که در مورد جویدن «متوسط» یا «بیشتر از حد کافی» را پاسخ داده‌اند؛ ۴. کسانی که ≥ ۱۰ دقیقه برای شام یا ناهار وقت صرف می‌کردند؛ ۵. کسانی که ≥ ۴ بار در هفته صبحانه می‌خوردند؛ ۶. مقدار P به دست آمده از آزمون χ^2

زمانی که آنالیزها به تفکیک جنس صورت گرفت، نه در مردان و نه در زنان در مدل‌های تعدیل شده، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی یافت نشد.

نسبت‌های شانس تعدیل شده برای ابتلا به اجزای یبوست عملکردی در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر در جدول ۴ آمده است. پس از تعدیل عوامل مخدوش‌گر، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین چاقی با خطر ابتلا به اجزای یبوست عملکردی چه در مردان وچه در زنان مشاهده نگردید. این نکته در مورد چاقی شکمی نیز صادق بود، به جز ارتباط معنی‌داری که بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به «احساس دفع ناکامل» وجود داشت؛ به طوری که مردان مبتلا به چاقی شکمی، از ۵۸ درصد (۹۵ CI: ۱/۰۵-۲/۳۷ درصد؛ OR = ۱/۵۸) شانس بیشتری برای داشتن «احساس دفع ناکامل» برخوردار بودند. این ارتباط در مردان بین چاقی شکمی با «تسهیل دفع مدفوع با استفاده از انگشت» نیز معنی‌دار بود (۹۵ CI: ۱/۰۷-۳/۵۷ درصد؛ OR = ۱/۹۵).

بررسی ارتباط چاقی و چاقی شکمی با تکرر بروز یبوست و اجزای یبوست عملکردی در کل افراد مورد مطالعه، حاکی از عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین چاقی با آن‌ها بود (جدول ۵). البته افراد چاق از ۲۶ درصد (۹۵ CI: ۰/۵۵-۰/۹۹ درصد؛ OR = ۰/۷۴) شانس کمتری برای ابتلا به «زور زدن» در مقایسه با افراد طبیعی برخوردار بودند. همچنین، افراد دارای اضافه وزن از ۲۲ درصد (۹۵ CI: ۰/۶۳-۰/۹۸ درصد؛ OR = ۰/۷۸) شانس کمتری برای داشتن «کمتر از سه بار اجابت مزاج در هفته» برخوردار بودند. به علاوه، ارتباط معنی‌داری بین «تسهیل دفع مدفوع با استفاده از انگشت» با چاقی شکمی مشاهده گردید.

جدول ۳. نسبت شانس ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر

		دور کمر	شاخص توده‌ی بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)			مقدار P[۲]	دور کمر			مقدار P[۲]
			< ۲۵ (n = ۲۳۷۷)	۲۵-۲۹/۹ (n = ۱۶۴۸)	≥ ۳۰ (n = ۴۳۲)		طبیعی (n = ۱۵۵۱)	اضافه وزن شکمی (n = ۱۰۱۳)	چاقی شکمی (n = ۱۰۳۹)	
کل افراد	یبوست	خام	۱/۰۰	۰/۹۴ (۰/۷۹-۱/۱۲)	۱/۱۷ (۰/۸۹-۱/۵۳)	۰/۵۶۰	۱/۰۰	۱/۰۷ (۰/۸۵-۱/۳۴)	۱/۴۹ (۱/۲۱-۱/۸۴)	< ۰/۰۰۱
	عملکردی	تعدیل شده[۱]	۱/۰۰	۰/۹۴ (۰/۷۳-۱/۲۲)	۰/۹۸ (۰/۶۵-۱/۴۶)	۰/۸۲۰	۱/۰۰	۰/۹۵ (۰/۷۲-۱/۲۵)	۱/۱۶ (۰/۸۴-۱/۵۹)	۰/۳۳۰
	یبوست	خام	۱/۰۰	۰/۹۶ (۰/۸۴-۱/۱۰)	۱/۳۲ (۱/۰۷-۱/۶۳)	۰/۱۲۰	۱/۰۰	۱/۱۷ (۰/۹۹-۱/۳۹)	۱/۶۴ (۱/۳۹-۱/۹۳)	< ۰/۰۰۱
		تعدیل شده	۱/۰۰	۱/۰۲ (۰/۸۷-۱/۲۰)	۱/۳۲ (۱/۰۳-۱/۷۱)	۰/۸۲۰	۱/۰۰	۱/۰۳ (۰/۸۳-۱/۲۸)	۱/۲۰ (۰/۹۳-۱/۵۴)	< ۰/۰۰۱
مردان	یبوست	خام	۱/۰۰	۰/۸۴ (۰/۶۱-۱/۱۶)	۰/۸۴ (۰/۴۸-۱/۴۶)	۰/۳۲۰	۱/۰۰	۰/۷۱ (۰/۴۷-۱/۱۰)	۱/۱۱ (۰/۷۰-۱/۷۷)	۰/۶۸۰
	عملکردی	تعدیل شده	۱/۰۰	۰/۷۶ (۰/۴۷-۱/۲۳)	۰/۶۷ (۰/۲۸-۱/۵۸)	۰/۲۴۰	۱/۰۰	۰/۷۶ (۰/۴۴-۱/۳۱)	۱/۴۱ (۰/۷۳-۲/۷۲)	۰/۷۸۰
	یبوست	خام	۱/۰۰	۰/۸۵ (۰/۶۸-۱/۰۵)	۰/۹۵ (۰/۶۶-۱/۳۸)	۰/۳۵۰	۱/۰۰	۰/۹۱ (۰/۶۸-۱/۲۱)	۱/۳۵ (۰/۹۷-۱/۸۷)	۰/۱۴۰
		تعدیل شده	۱/۰۰	۰/۸۱ (۰/۶۲-۱/۰۵)	۰/۸۷ (۰/۵۶-۱/۳۶)	۰/۱۱۰	۱/۰۰	۰/۹۰ (۰/۶۳-۱/۳۱)	۱/۵۵ (۰/۹۸-۲/۴۴)	۰/۲۸۰
زنان	یبوست	خام	۱/۰۰	۱/۱۵ (۰/۹۲-۱/۴۲)	۱/۳۷ (۰/۹۹-۱/۸۸)	۰/۰۳۰	۱/۰۰	۱/۰۵ (۰/۸۰-۱/۳۹)	۱/۱۹ (۰/۹۲-۱/۵۳)	۰/۱۶۰
	عملکردی	تعدیل شده	۱/۰۰	۱/۰۸ (۰/۷۹-۱/۴۸)	۱/۲۰ (۰/۷۵-۱/۹۱)	۰/۴۲۰	۱/۰۰	۱/۰۷ (۰/۷۷-۱/۵۰)	۱/۱۲ (۰/۷۷-۱/۶۲)	۰/۵۴۰
	یبوست	خام	۱/۰۰	۱/۲۱ (۱/۰۲-۱/۴۵)	۱/۶۵ (۱/۲۶-۲/۱۵)	< ۰/۰۰۱	۱/۰۰	۱/۱۲ (۰/۸۹-۱/۴۱)	۱/۲۸ (۱/۰۴-۱/۵۸)	۰/۰۱۰
		تعدیل شده	۱/۰۰	۱/۱۹ (۰/۹۶-۱/۴۷)	۱/۶۴ (۱/۲۰-۲/۲۶)	۰/۰۸۰	۱/۰۰	۱/۱۴ (۰/۸۷-۱/۴۹)	۱/۰۸ (۰/۸۰-۱/۴۷)	۰/۶۰۰

۱. اثر سن، جنس، فعالیت بدنی، مصرف سیگار، تعداد وعده‌های غذایی، نظم وعده‌های غذایی، وضعیت جویدن، خوردن سریع ناهار، خوردن سریع شام، خوردن صبحانه، مصرف نوشیدنی، مصرف مواد غذایی سرخ شده تعدیل شده است. در آنالیزها به تفکیک جنس، متغیر جنس تعدیل نشده است.؛ ۲. مقدار P به دست آمده از رگرسیون لجستیک با در نظر گرفتن سطوح مختلف شاخص توده‌ی بدنی یا دور کمر به عنوان یک متغیر پیوسته.

زمانی که آنالیزها به افراد مبتلا به یبوست عملکردی نیز محدود گردید، ارتباط معنی‌داری بین چاقی و چاقی شکمی با یبوست و اجزای یبوست عملکردی مشاهده نشد. البته افراد دارای اضافه وزن، از ۴۶ درصد (۰/۳۳-۰/۸۸ :CI ۹۵ درصد؛ ۰/۵۴ = OR) شانس کمتری برای داشتن «کمتر از سه بار اجابت مزاج در هفته» نسبت به افراد طبیعی برخوردار بودند. همچنین، ارتباط معکوس معنی‌داری بین چاقی شکمی با خطر داشتن «مدفوع سفت و پشکل مانند» مشاهده شد.

جدول ۴. نسبت‌های شانس تعدیل شده برای ابتلا به اجزای یبوست عملکردی در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر[1]

	شاخص توده‌ی بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)				دور کمر	
	< ۲۵	۲۵-۲۹/۹	≥ ۳۰	طبیعی	اضافه وزن شکمی	چاقی شکمی
مردان						
زور زدن	۱/۰۰	۰/۷۷ (۰/۴۲-۱/۴۱)	۰/۸۲ (۰/۲۹-۲/۲۸)	۱/۰۰	۰/۹۳ (۰/۴۸-۱/۸۰)	۱/۰۲ (۰/۴۳-۲/۴۱)
مدفوع سفت و خشک	۱/۰۰	۰/۵۴ (۰/۲۲-۱/۳۲)	۰/۸۷ (۰/۱۷-۴/۳۷)	۱/۰۰	۰/۶۳ (۰/۲۴-۱/۶۸)	۰/۱۷ (۰/۰۲-۱/۴۸)
احساس دفع ناکامل	۱/۰۰	۰/۷۴ (۰/۵۶-۰/۹۹)	۰/۶۱ (۰/۳۷-۱/۰۱)	۱/۰۰	۱/۱۸ (۰/۸۶-۱/۶۱)	۱/۵۸ (۱/۰۵-۲/۳۷)
احساس پر بودن رکتوم	۱/۰۰	۰/۸۴ (۰/۶۰-۱/۱۸)	۰/۶۸ (۰/۳۸-۱/۲۵)	۱/۰۰	۰/۹۰ (۰/۶۲-۱/۳۱)	۱/۳۸ (۰/۸۶-۲/۲۰)
استفاده از کمک دست برای دفع	۱/۰۰	۰/۹۶ (۰/۶۰-۱/۵۲)	۰/۶۰ (۰/۲۶-۱/۳۵)	۱/۰۰	۱/۳۲ (۰/۸۱-۲/۱۷)	۱/۹۵ (۱/۰۷-۳/۵۷)
کمتر از ۳ بار دفع مدفوع در هفته	۱/۰۰	۱/۷۴ (۰/۷۴-۴/۰۶)	۰/۶۴ (۰/۰۷-۵/۹۱)	۱/۰۰	۰/۲۳ (۰/۰۷-۰/۷۹)	۰/۶۸ (۰/۱۹-۲/۳۲)
زنان						
زور زدن	۱/۰۰	۱/۰۵ (۰/۷۱-۱/۵۵)	۱/۱۳ (۰/۶۳-۲/۰۲)	۱/۰۰	۱/۱۶ (۰/۷۷-۱/۷۶)	۱/۰۳ (۰/۶۴-۱/۶۴)
مدفوع سفت و خشک	۱/۰۰	۰/۸۵ (۰/۵۱-۱/۴۱)	۰/۹۷ (۰/۴۹-۱/۹۳)	۱/۰۰	۰/۶۲ (۰/۳۶-۱/۰۹)	۱/۲۰ (۰/۶۸-۲/۱۰)
احساس دفع ناکامل	۱/۰۰	۱/۲۲ (۰/۹۴-۱/۵۸)	۱/۴۴ (۰/۹۶-۲/۱۵)	۱/۰۰	۱/۰۸ (۰/۸۳-۱/۴۰)	۰/۹۶ (۰/۷۱-۱/۲۹)
احساس پر بودن رکتوم	۱/۰۰	۱/۰۸ (۰/۸۳-۱/۴۱)	۱/۱۲ (۰/۷۵-۱/۶۷)	۱/۰۰	۱/۲۳ (۰/۹۳-۱/۶۱)	۱/۲۶ (۰/۹۲-۱/۷۳)
استفاده از کمک دست برای دفع	۱/۰۰	۰/۹۵ (۰/۷۱-۱/۲۹)	۱/۳۰ (۰/۸۴-۲/۰۰)	۱/۰۰	۱/۰۳ (۰/۷۵-۱/۴۱)	۱/۲۶ (۰/۸۸-۱/۷۹)
کمتر از ۳ بار دفع مدفوع در هفته	۱/۰۰	۱/۲۷ (۰/۷۶-۲/۱۱)	۱/۴۶ (۰/۷۱-۲/۹۸)	۱/۰۰	۰/۷۲ (۰/۴۲-۱/۲۶)	۰/۸۱ (۰/۴۴-۱/۴۷)

۱. اثر سن، فعالیت بدنی، مصرف سیگار، تعداد وعده‌های غذایی، نظم وعده‌های غذایی، وضعیت جویدن، خوردن سریع ناهار، خوردن سریع شام، خوردن صبحانه، مصرف نوشیدنی، مصرف مواد غذایی سرخ شده تعدیل شده است.

جدول ۵. نسبت‌های شانس تعدیل شده برای تکرر یبوست و اجزای یبوست عملکردی در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر

	شاخص توده‌ی بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)				دور کمر	
	< ۲۵	۲۵-۲۹/۹	≥ ۳۰	طبیعی	اضافه وزن شکمی	چاقی شکمی
در میان همه‌ی افراد						
یبوست	۱/۰۰	۰/۹۸ (۰/۸۲-۱/۱۷)	۰/۸۲ (۰/۶۲-۱/۱۰)	۱/۰۰	۱/۰۹ (۰/۹۱-۱/۳۱)	۱/۰۰ (۰/۷۹-۱/۳۱)
زور زدن	۱/۰۰	۰/۹۵ (۰/۷۹-۱/۱۳)	۰/۷۴ (۰/۵۵-۰/۹۹)	۱/۰۰	۱/۱۶ (۰/۹۷-۱/۴۰)	۱/۲۰ (۰/۹۶-۱/۵۱)
مدفوع سفت و خشک	۱/۰۰	۰/۸۹ (۰/۷۴-۱/۰۸)	۰/۷۸ (۰/۵۷-۱/۰۶)	۱/۰۰	۱/۰۱ (۰/۸۳-۱/۲۳)	۱/۰۲ (۰/۸۰-۱/۲۹)
احساس دفع ناکامل	۱/۰۰	۰/۹۲ (۰/۷۷-۱/۱۰)	۰/۹۷ (۰/۷۳-۱/۳۰)	۱/۰۰	۱/۱۴ (۰/۹۴-۱/۳۷)	۱/۲۳ (۰/۹۸-۱/۵۵)
احساس پر بودن رکتوم	۱/۰۰	۰/۹۱ (۰/۷۴-۱/۱۱)	۰/۹۴ (۰/۶۹-۱/۲۸)	۱/۰۰	۱/۱۰ (۰/۹۰-۱/۳۵)	۱/۲۵ (۰/۹۷-۱/۶۰)
استفاده از کمک دست برای دفع	۱/۰۰	۰/۹۶ (۰/۷۶-۱/۲۱)	۱/۰۷ (۰/۷۵-۱/۵۲)	۱/۰۰	۱/۱۹ (۰/۹۳-۱/۵۲)	۱/۴۱ (۱/۰۶-۱/۸۸)
کمتر از ۳ بار دفع مدفوع در هفته	۱/۰۰	۰/۷۸ (۰/۶۳-۰/۹۸)	۰/۷۵ (۰/۵۳-۱/۰۷)	۱/۰۰	۱/۱۶ (۰/۹۲-۱/۴۶)	۱/۲۳ (۰/۹۳-۱/۶۳)
در میان افراد مبتلا به یبوست عملکردی						
یبوست	۱/۰۰	۱/۳۲ (۰/۸۴-۲/۰۷)	۱/۴۱ (۰/۷۳-۲/۷۱)	۱/۰۰	۰/۶۵ (۰/۴۰-۱/۰۶)	۰/۶۳ (۰/۳۷-۱/۱۰)
زور زدن	۱/۰۰	۱/۰۹ (۰/۶۹-۱/۷۴)	۱/۱۹ (۰/۶۰-۲/۳۵)	۱/۰۰	۰/۹۲ (۰/۵۶-۱/۵۲)	۰/۹۵ (۰/۵۴-۱/۶۶)
مدفوع سفت و خشک	۱/۰۰	۱/۰۹ (۰/۷۰-۱/۷۰)	۱/۲۵ (۰/۶۵-۲/۴۱)	۱/۰۰	۰/۶۳ (۰/۳۹-۱/۰۲)	۰/۵۲ (۰/۳۰-۰/۹۰)
احساس دفع ناکامل	۱/۰۰	۱/۱۵ (۰/۶۹-۱/۹۳)	۰/۹۲ (۰/۴۳-۱/۹۹)	۱/۰۰	۱/۳۳ (۰/۷۶-۲/۳۲)	۱/۰۲ (۰/۵۴-۱/۹۳)
احساس پر بودن رکتوم	۱/۰۰	۰/۹۲ (۰/۵۶-۱/۵۲)	۰/۹۱ (۰/۴۳-۱/۹۰)	۱/۰۰	۱/۰۳ (۰/۶۰-۱/۷۷)	۰/۷۱ (۰/۳۹-۱/۲۹)
استفاده از کمک دست برای دفع	۱/۰۰	۰/۸۶ (۰/۵۴-۱/۳۷)	۱/۴۷ (۰/۷۶-۲/۸۲)	۱/۰۰	۱/۰۳ (۰/۶۳ -۱/۶۹)	۰/۹۸ (۰/۵۶-۱/۷۰)
کمتر از ۳ بار دفع مدفوع در هفته	۱/۰۰	۰/۵۴ (۰/۳۳-۰/۸۸)	۰/۴۹ (۰/۲۴-۱/۰۰)	۱/۰۰	۱/۳۳ (۰/۷۶-۲/۳۲)	۱/۰۲ (۰/۵۴-۱/۹۳)

بررسی ارتباط چاقی و چاقی شکمی با شدت علایم یبوست عملکردی در جدول ۶ آمده است. ارتباط معنی‌داری بین چاقی با شدت هیچ کدام از علایم یبوست عملکردی وجود نداشت، به جز در مورد «کمتر از سه بار اجابت مزاج در هفته»، که هم اضافه وزن و هم چاقی، خطر شدید بودن آن را افزایش می‌داد. ارتباط معنی‌داری بین چاقی شکمی با شدت علایم یبوست عملکردی مشاهده نشد، به جز در مورد «کمتر از سه بار اجابت مزاج در هفته» که به طور معکوس با چاقی شکمی ارتباط داشت.

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، پس از تعدیل عوامل مخدوش‌گر، ارتباط معنی‌داری بین چاقی و ابتلا به یبوست مشاهده شد (CI: ۱/۰۳–۱/۷۱ ۹۵ درصد؛ OR = ۱/۳۲)؛ اگر چه در کل افراد مورد بررسی، ارتباط معنی‌داری بین چاقی با خطر ابتلا به یبوست عملکردی چه در مدل خام و چه در مدل تعدیل شده مشاهده نشد. بررسی ارتباط چاقی شکمی با یبوست و یبوست عملکردی در کل افراد مورد مطالعه، حاکی از وجود ارتباط‌های معنی‌دار بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی در مدل خام بود، اما تعدیل برای عوامل مخدوش‌گر، باعث از بین رفتن این ارتباط‌ها گردید.

آنالیزها به تفکیک جنس، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین چاقی و خطر ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی در مردان نشان نداد؛ اما در زنان، ارتباط معنی‌داری بین چاقی با خطر ابتلا به یبوست مشاهده شد. در مورد یبوست عملکردی نیز ارتباط غیر معنی‌داری بین چاقی و افزایش احتمال یبوست عملکردی در زنان مشاهده شد. این در حالی بود که هیچ ارتباط معنی‌داری بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به یبوست و یبوست عملکردی چه در زنان و چه در مردان مشاهده نشد. در بررسی اجزای یبوست عملکردی، ارتباط معنی‌داری بین چاقی با خطر ابتلا به این اجزا چه در مردان و چه در زنان مشاهده نگردید. این نکته در مورد چاقی شکمی نیز صادق بود، به غیر از ارتباط معنی‌داری که بین چاقی شکمی با خطر ابتلا به «احساس دفع ناکامل» و «تسهیل دفع مدفوع با استفاده از انگشت» وجود داشت.

بررسی ارتباط چاقی و چاقی شکمی با تکرر بروز یبوست و اجزای یبوست عملکردی در کل افراد مورد مطالعه، حاکی از عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین چاقی با آن‌ها بود و البته ارتباط معکوس معنی‌داری بین چاقی شکمی با خطر داشتن «مدفوع سفت و پشکل مانند» و اضافه وزن با «کمتر از سه بار اجابت مزاج در هفته» وجود داشت. ارتباط معنی‌داری بین چاقی با شدت هیچ کدام از علایم یبوست عملکردی وجود نداشت، به استثنای «کمتر از سه بار اجابت مزاج در هفته» که هم اضافه وزن و هم چاقی، خطر شدید بودن آن را افزایش می‌داد که البته ممکن است به علت وجود تعداد افراد بیشتر در این دسته بوده باشد.

در یک مطالعه مقطعی در برزیل بر روی ۱۰۷۷ فرد بزرگسال، ارتباط معنی‌داری بین یبوست و اضافه وزن یافت نشد (۱۶). مطالعه‌ی دیگری در ایتالیا بر روی ۱۹۸۷ نفر افراد ۷۰–۶ سال، نشان داد که یبوست در افراد چاق، شایع‌تر بود (۱۷). در یک مطالعه‌ی مبتنی بر جامعه که بر روی ۱۸۱۸۰ بزرگسال در تهران انجام شد، شیوع بالای اضافه وزن و چاقی در مبتلایان به یبوست عملکردی مشاهده شد (۳).

البته تفاوت نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعات قبلی به دلیل طراحی متفاوت، نمونه‌گیری متفاوت، حجم نمونه‌ی متفاوت، سن افراد مورد مطالعه، سال انجام مطالعه و به دنبال آن، تغییر سبک زندگی افراد و به طور قطع، تفاوت‌های نژادی و فرهنگی در جمعیت مورد مطالعه است. به طور مثال در مطالعه‌ای در تهران، از کل افراد نمونه، تنها افرادی وارد مطالعه شدند که یک علامت گوارشی داشتند که این نه تنها موجب کاهش افراد مورد بررسی می‌شد، بلکه علایم گوارشی شامل علایم یبوست عملکردی در پرسش‌نامه‌ی ROME III نمی‌باشد و تنها سؤال مرتبط با یبوست، گزارش فردی است؛ در صورتی که ممکن است فردی به زعم خودش مبتلا به یبوست نباشد، اما معیارهای ROME III برای یبوست را به دست آورد. در نتیجه، یبوستی که خود فرد گزارش کند، از حساسیت کمی برخوردار است (۹).

جدول ۶. نسبت‌های شانس تعدیل شده برای شدت علایم یبوست عملکردی در بین رده‌های مختلف شاخص توده‌ی بدنی و دور کمر

	شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر متر مربع)				دور کمر	
	< ۲۵	۲۵–۲۹/۹	≥ ۳۰	طبیعی	اضافه وزن شکمی	چاقی شکمی
یبوست	۱/۰۰	۰/۹۴ (۰/۶۱–۱/۴۴)	۱/۰۱ (۰/۵۴–۱/۸۹)	۱/۰۰	۰/۷۷ (۰/۴۹–۱/۲۲)	۱/۰۵ (۰/۶۲–۱/۷۶)
زور زدن	۱/۰۰	۱/۳۱ (۰/۸۵–۲/۰۱)	۱/۳۸ (۰/۷۳–۲/۵۹)	۱/۰۰	۰/۶۵ (۰/۴۱–۱/۰۴)	۰/۷۲ (۰/۴۲–۱/۲۱)
مدفوع سفت و خشک	۱/۰۰	۱/۲۳ (۰/۷۹–۱/۹۲)	۱/۴۷ (۰/۷۶–۲/۸۳)	۱/۰۰	۰/۶۳ (۰/۳۹–۱/۰۱)	۰/۸۸ (۰/۵۱–۱/۵۱)
احساس دفع ناکامل	۱/۰۰	۱/۲۱ (۰/۷۸–۱/۸۶)	۱/۱۳ (۰/۶۰–۲/۱۴)	۱/۰۰	۰/۸۶ (۰/۵۴–۱/۳۷)	۰/۶۰ (۰/۳۵–۱/۰۲)
احساس پر بودن رکتوم	۱/۰۰	۱/۲۲ (۰/۷۹–۱/۸۹)	۰/۸۰ (۰/۴۱–۱/۵۳)	۱/۰۰	۱/۰۵ (۰/۶۵–۱/۶۷)	۱/۰۲ (۰/۶۰–۱/۷۳)
استفاده از دست برای کمک به دفع	۱/۰۰	۱/۴۴ (۰/۹۰–۲/۳۰)	۰/۷۴ (۰/۳۸–۱/۴۴)	۱/۰۰	۰/۷۵ (۰/۴۵–۱/۲۲)	۱/۰۵ (۰/۶۰–۱/۸۴)
کمتر از ۳ بار اجابت مزاج در هفته	۱/۰۰	۲/۰۸ (۱/۲۵–۳/۴۵)	۲/۳۷ (۱/۱۴–۴/۹۳)	۱/۰۰	۰/۴۸ (۰/۲۸–۰/۸۲)	۰/۴۸ (۰/۲۶–۰/۸۷)

در توجیه یافته‌های مطالعه به ویژه یافته‌های گروه زنان، می‌توان گفت که بر اساس مطالعات قبلی، چاقی از طریق ایجاد تغییرات هورمونی، می‌تواند منجر به ایجاد یبوست شود (۱۸)؛ که به نظر می‌رسد این تغییرات هورمونی در زنان بیشتر باشد و یا به علت تداخل با هورمون‌های زنانه این اثر افزایش یابد؛ چرا که هورمون‌های جنسی روی حرکات دستگاه گوارش و سیستم عصبی اتونوم اثر می‌گذارند (۹). در مرحله‌ی لوتئال چرخه‌ی قاعدگی، هنگامی که سطح پروژسترون پلاسما بالا است، زمان ترانزیت گوارشی طولانی می‌شود (۲۳). چاقی با افزایش ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی و افزایش التهاب، به نوبه‌ی خود باعث اختلال حرکتی (۱۹) و تغییر در حرکات لوله گوارش می‌گردد. همان‌گونه که می‌دانیم زنان به تغییرات التهابی حساس‌ترند؛ به گونه‌ای که بروز بیماری‌های التهابی در زنان بیشتر است و شاید افزایش خطر یبوست در زنان چاق به این علت باشد.

از نقاط قوت مطالعه‌ی حاضر، می‌توان به حجم نمونه‌ی بالای آن، استفاده از معیار ROME III که از قبل برای تشخیص یبوست عملکردی اعتبارسنجی شده است، بررسی ارتباط با چاقی شکمی علاوه بر چاقی عمومی، در نظر گرفتن تمام عوامل مخدوش‌گر و بررسی تکرر و شدت اجزای یبوست عملکردی با وضعیت چاقی (که در مطالعات مشابه وجود نداشت) اشاره کرد. البته در کنار آن، باید نقاط ضعف در تفسیر داده‌های به دست آمده مد نظر قرار گیرد. به علت مقطعی بودن مطالعه، رابطه‌ی علیتی قابل استنتاج نیست. به علاوه، شیوع چاقی و عوامل خطر مرتبط با آن، با استفاده از پرسش‌نامه‌ی خود- اجرا بررسی شد که به علت خطای طبقه‌بندی، می‌تواند بر روی نتایج مؤثر باشد. درصد قابل توجهی از جمعیت مورد مطالعه تحصیل کرده بودند که این خود نشان دهنده‌ی نیاز به مطالعات بیشتر جهت بررسی این ارتباط می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی این که در این جمعیت بزرگ‌سال، چاقی عمومی با یبوست ارتباط معنی‌دار داشت، اما چاقی شکمی با یبوست و یبوست عملکردی مرتبط نبود. چاقی عمومی در زنان موجب افزایش معنی‌دار خطر ابتلا به یبوست می‌شد؛ در حالی که ارتباطی بین چاقی شکمی با یبوست و یبوست عملکردی چه در زنان و چه در مردان، و همچنین بین چاقی عمومی و یبوست و یبوست عملکردی در مردان یافت نشد. همچنین، ارتباط معنی‌داری بین چاقی شکمی با «احساس دفع ناکامل» و «تسهیل دفع مدفوع با استفاده از انگشت» مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای نجمه سالک به شماره‌ی طرح ۲۹۲۰۱۳ مصوب مرکز تحقیقات جامع عملکردی گوارش دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله از مرکز تحقیقات جامع عملکردی گوارش برای حمایت مالی این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین، از تمامی کارکنان دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت شرکت در این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Talley NJ. Definitions, epidemiology, and impact of chronic constipation. Rev Gastroenterol Disord 2004; 4(Suppl 2): S3-S10.
2. Higgins PD, Johanson JF. Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. Am J Gastroenterol 2004; 99(4): 750-9.
3. Pourhoseinghol MA, Kaboli SA, Pourhoseingholi A, Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Khoshkrood Mansoori B, et al. Obesity and functional constipation; a community-based study in Iran. J Gastrointestin Liver Dis 2008; 18(2): 151-5.
4. Chang JY, Locke GR, Schleck CD, Zinsmeister AR, Talley NJ. Risk factors for chronic constipation and a possible role of analgesics. Neurogastroenterol Motil 2007; 19(11): 905-11.
5. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. Gastroenterology 2006; 130(5): 1480-91.
6. Dennison C, Prasad M, Lloyd A, Bhattacharyya SK, Dhawan R, Coyne K. The health-related quality of life and economic burden of constipation. Pharmacoeconomics 2005; 23(5): 461-76.
7. Wald A, Scarpignato C, Kamm MA, Mueller-Lissner S, Helfrich I, Schuijt C, et al. The burden of constipation on quality of life: results of a multinational survey. Aliment Pharmacol Ther 2007; 26(2): 227-36.
8. Roshandel D, Rezailashkajani M, Shafaee S, Zali MR. A cost analysis of functional bowel disorders in Iran. Int J Colorectal Dis 2007; 22(7): 791-9.
9. Kaboli SA, Pourhoseingholi MA, Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Habibib M, Pourhoseingholi A. Factors associated with functional constipation in Iranian adults: a population-based study. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2010; 3(2): 83-90.
10. Khatri PK, Ali AD, Alzadjali N, Bhagia G, Khaliqdina SJ, Aziz S. Frequency of functional constipation in 3 different populations and its causative factors. J Pak Med Assoc 2011; 61(11): 1149-52.
11. Nakaji S, Tokunaga S, Sakamoto J, Todate M, Shimoyama T, Umeda T, et al. Relationship between lifestyle factors and defecation in a Japanese population. Eur J Nutr 2002; 41(6): 244-8.
12. Arnaud MJ. Mild dehydration: a risk factor of constipation? Eur J Clin Nutr 2003; 57(Suppl 2): S88-S95.
13. Morais MB, Vitolo MR, Aguirre AN, Fagundes-Neto

U. Measurement of low dietary fiber intake as a risk factor for chronic constipation in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999; 29(2): 132-5.
14. Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Takahashi Y, Hosoi Y, Itabashi M. Association between dietary fiber, water and magnesium intake and functional constipation among young Japanese women. Eur J Clin Nutr 2007; 61(5): 616-22.
15. Ghoshal UC. Review of pathogenesis and management of constipation. Trop Gastroenterol 2007; 28(3): 91-5.
16. Costa ML, Oliveira JN, Tahan S, Morais MB. Overweight and constipation in adolescents. BMC Gastroenterol 2011; 11: 40.
17. Pecora P, Suraci C, Antonelli M, De MS, Marrocco W. Constipation and obesity: a statistical analysis. Boll Soc Ital Biol Sper 1981; 57(23): 2384-8.
18. Pashankar DS, Loening-Baucke V. Increased prevalence of obesity in children with functional constipation evaluated in an academic medical center. Pediatrics 2005; 116(3): e377-e380.
19. Bercik P, Verdu EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? Gastroenterol Clin North Am 2005; 34(2): 235-vii.
20. Azizi F, Azadbakht L, Mirmiran P. Trends in overweight, obesity and central fat accumulation among Tehranian adults between 1998-1999 and 2001-2002: Tehran lipid and glucose study. Ann Nutr Metab 2005; 49(1): 3-8.
21. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation 2002; 106(25): 3143-421.
22. Aminian-far S, Saneei P, Nouri M, Shafiei R, Hassanzadeh-Keshteli A, Esmaillzadeh A, et al. Validation Study of Self-Reported Anthropometric Indices among the Staff of the Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran J Isfahan Med Sch 2015; 33(346): 1318-27. [In Persian].
23. Wald A, Van Thiel DH, Hoechstetter L, Gavaler JS, Egler KM, Verm R, et al. Gastrointestinal transit: the effect of the menstrual cycle. Gastroenterology 1981; 80(6): 1497-500.

Journal of Isfahan Medical School Received: 14.10.2015

Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016 Accepted: 21.01.2016

The Association between Obesity, Constipation, and Functional Constipation in Iranian Adults

Najmeh Salek[1], Adeleh Dadkhah[1], Parvaneh Saneei MSc[2], Ammar Hassanzadeh-Keshteli MD[3], Ahmad Esmaillzadeh PhD[4], Peyman Adibi MD[5]

Original Article

Abstract

Background: Constipation is a common disorder of the gastrointestinal tract which affects the quality of life (QOL) of patients. However, findings of studies on the relationship between obesity and constipation are conflicting. The aim of the present study was to assess the relationship of general and central obesity with constipation and functional constipation in a large group of Iranian adults.

Methods: This cross-sectional study was conducted on 4457 adults, through obtaining anthropometric measures using a validated self-report questionnaire. The subjects were classified into three categories of normal weight, overweight, and obese based on their body mass index (BMI) and normal, central overweight, and central obesity based on their waist circumference. The prevalence of constipation, functional constipation, and its components was investigated according to Rome III criteria.

Findings: The prevalence of constipation and functional constipation among the study population was 33.6% and 15.3%, respectively. After adjustment for potentially confounding factors, obese individuals were at a 32% greater risk of constipation compared to those with normal BMI (OR: 1.32; 95% CI: 1.03-1.71). There was no significant association between general obesity and functional constipation. Gender-stratified analysis revealed a significant association between overweight and obesity, and constipation among women in the crude model; overweight women (OR: 1.21; 95% CI: 1.02-1.45) and obese women compared to women with normal BMI (OR: 1.65; 95% CI: 1.26-2.15) were 21% and 65% more likely to have constipation. Although significant associations were found between abdominal obesity, and constipation and functional constipation in the crude model, these associations disappeared with adjustment for confounding factors. Gender-stratified analysis revealed no significant associations between abdominal obesity, and risk of constipation or functional constipation in men or women.

Conclusion: General obesity was associated with a significant increase in the risk of constipation, while abdominal obesity was not associated with constipation and functional constipation. General obesity was related to increased risk of constipation in women. However, no significant association was found between constipation and functional constipation, and obesity or abdominal obesity in men.

Keywords: Constipation, Functional constipation, Body mass index (BMI), General obesity, Abdominal obesity

Citation: Salek N, Dadkhah A, Saneei P, Hassanzadeh-Keshteli A, Esmaillzadeh A, Adibi P. **The Association between Obesity, Constipation, and Functional Constipation in Iranian Adults.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2429-39

1- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD Candidate, Food Security Research Center AND Student Research Committee AND Department of Nutrition, School of Nutrition and Food Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- General Practitioner, Integrative Functional Gastroenterology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Professor, Food Security Research Center AND Department of Community Nutrition, School of Nutrition and Food Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Professor, Integrative Functional Gastroenterology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Peyman Adibi MD, Email: adibi@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۵

بررسی فراوانی نسبی دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و مقایسه با گروه شاهد

دکتر بهرام پاکزاد[۱]، نیما عباسی ولدانی[۲]، مجتبی اکبری[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کبد چرب غیر الکلی، شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی در کشورهای صنعتی غربی است. پاتوژنز کبد چرب غیر الکلی به طور قطعی مشخص نشده است، اما بیشترین و گسترده‌ترین تئوری که حمایت می‌شود، مکانیسم مقاومت به انسولین است. از این رو، هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی فراوانی نسبی دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی بود.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر بر روی ۸۰ فرد بیمار و ۲۶ فرد سالم که از لحاظ سن و جنس با بیماران همسان‌سازی شده بودند، انجام گرفت. کبد چرب غیر الکلی در بیماران با استفاده از سونوگرافی به اثبات رسید و بیماران انتخاب شدند. از هر فرد، ۵ سی‌سی خون دریافت و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال شد و مورد آنالیز قرار گرفت. داده‌های کمی با استفاده از آزمون t و داده‌های کیفی با استفاده از آزمون χ^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در صورت نیاز، از آزمون‌های Multivariate نظیر انواع رگرسیون استفاده شد.

یافته‌ها: از کل شرکت کنندگان، ۶۴ نفر (۶۰/۳ درصد) زن و ۴۲ نفر (۳۹/۷ درصد) مرد بودند. میانگین سنی افراد در گروه مورد، برابر با ۱۰/۸ ± ۴۸/۸ سال و در گروه شاهد، برابر با ۱۳/۴ ± ۴۲/۳ سال بود. از کل افراد مورد مطالعه، ۴۴ نفر (۴۱/۵ درصد) مبتلا به پره‌دیابت و ۱۱ نفر (۱۰/۴ درصد) مبتلا به دیابت بودند که همگی در گروه مورد بودند و در گروه شاهد، هیچ فردی مبتلا به پره‌دیابت ($P < ۰/۰۰۱$) یا دیابت ($P = ۰/۰۴۶$)نبود. پس از حذف سن به عنوان یک عامل مخدوش‌گر، هموگلوبین A1c (Glycated hemoglobin)، قند خون ناشتا، انسولین، کلسترول، Aspartate transaminase (AST)، Alanine transaminase (ALT) و قند خون دو ساعته، تنها متغیرهایی بودند هنوز تفاوت معنی‌داری میان دو گروه داشتند و در گروه مورد بیشتر بودند. همچنین، با حذف Body mass index (BMI) به عنوان یک عامل مخدوش‌گر، تنها هموگلوبین A1c، قند خون ناشتا، انسولین و ALT تفاوت معنی‌داری میان دو گروه نشان دادند.

نتیجه‌گیری: شیوع دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکی بالا می‌باشد که حتی با حذف عوامل مخدوش‌گر، عوامل مرتبط با دیابت مانند هموگلوبین A1c، قند خون ناشتا و انسولین، با این بیماری ارتباط معنی‌داری دارد. این امر، نشان دهنده‌ی ارتباط محکم میان این دو بیماری می‌باشد.

واژگان کلیدی: کبد چرب غیر الکلی، دیابت، پره‌دیابت

ارجاع: پاکزاد بهرام، عباسی ولدانی نیما، اکبری مجتبی. **بررسی فراوانی نسبی دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و مقایسه با گروه شاهد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۴۷-۲۴۴۰

مقدمه

کبد چرب غیر الکلی، یک طیف وسیع از وضعیت آسیب‌های بالینی است که با رسوب چربی در پارانشیم کبد در بیمارانی که الکل مصرف نکرده‌اند شناخته می‌شود (۱). کبد چرب غیر الکلی، شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی در کشورهای صنعتی غربی است و شیوع آن، ۴۰-۲۰ درصد جمعیت عمومی می‌باشد (۲). تخمین زده می‌شود که شیوع این بیماری در Asia-Pacific از ۳۰-۵ درصد بسته به مطالعات جمعیتی، متفاوت است. شیوع کبد چرب غیر الکلی در مردان، افراد مسن و کسانی که دارای فشار خون بالا، چاقی و دیابت هستند، افزایش می‌یابد (۳).

پاتوژنز کبد چرب غیر الکلی، به طور قطعی مشخص نشده است، اما بیشترین و گسترده‌ترین تئوری که حمایت می‌شود، مکانیسم مقاومت به انسولین است که باعث Hepatic steatosis می‌شود (۴). بیشترین بیماران دچار کبد چرب غیر الکلی بی‌علامت هستند، اگر چه

۱- استادیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- کارشناس ارشد، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: نیما عباسی ولدانی
Email: nima.abbasi69@yahoo.com

خستگی، ضعف و احساس ناراحتی در قسمت فوقانی راست شکم، باعث ترغیب بیماران برای بررسی‌های پزشکی می‌شود. بیشترین تظاهر این بیماری، افزایش آمینوترانسفرازهای کبدی در بررسی‌های معمول آزمایشگاهی می‌باشد. در ۹۰ درصد بیماران، سطح سرمی Alanine transaminase (ALT) و Aspartate transaminase (AST) افزایش می‌یابد (۵). در این طیف وسیع، استئاتوره به تنهایی به نظر خوش‌خیم می‌آید، اما Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) که با رژنراسیون بالون مانند و فیبروز پری‌سلولار شناخته می‌شود، می‌تواند پیشرفت کند (۷-۶) و به سیروز تبدیل شود.

دیابت ملیتوس، مجموعه‌ای از بیماری‌ها می‌باشد که با هایپرگلایسمی و مقاومت به انسولین شناخته می‌شود. دیابت ملیتوس، یکی از مشکلات بزرگ در زمینه‌ی سلامت عمومی در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه است (۸). هر چند عوامل خطر ایجاد دیابت در کشورهای مختلف با هم تفاوت دارد، اما تخمین زده می‌شود که میزان آن در سال ۲۰۳۰ بیش از دو برابر میزان آن در سال ۲۰۰۰ خواهد بود (۹). سابقه‌ی خانوادگی مثبت، نژاد، جنس مؤنث و وضعیت‌های مرتبط با مقاومت به انسولین، عوامل خطر در زمینه‌ی ایجاد دیابت هستند (۴).

پره‌دیابت نیز دوره‌ای قبل از بروز دیابت است و با قند خون ناشتای مختل (قند بین ۱۲۵-۱۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و اختلال عمل گلوکز (قند بین ۱۴۰-۹۹ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) شناخته می‌شود (۱۱-۱۰). همچنین، اگر میزان Glycated hemoglobin (HbA1c) بین ۶/۴-۵/۷ درصد باشد، نشان دهنده‌ی وجود پره‌دیابت در بالغین می‌باشد، اما مطالعات بیشتری در مورد اطفال نیاز است (۱۱).

تشخیص دیابت ملیتوس نوع دو، بر اساس راهنمای American diabetes association (ADA) شامل وجود یکی از ۴ معیار زیر می‌باشد:

۱) قند خون ناشتا (Fast blood sugar یا FBS) > ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر،

۲) علامت هایپرگلایسمی و داشتن گلوکز > ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در یک نمونه‌گیری اتفاقی گلوکز پلاسمای وریدی،

۳) Oral glucose tolerance test (OGTT) مختل که عبارت از گلوکز پلاسما > ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر است که ۲ ساعت بعد از گرفتن گلوکز خوراکی به میزان ۱/۷۵ گرم بر کیلوگرم (حداکثر ۷۵ گرم) اندازه‌گیری شود،

۴) HbA1c > ۶/۵ درصد (۱۱).

دیابت نوع ۱، نتیجه‌ی فقدان خود ایمنی سلول‌های تولید کننده‌ی انسولین به نام سلول بتا در جزایر لانگرهانس است که از نظر تشخیص آزمایشگاهی، مشابه دیابت نوع ۲ می‌باشد (۱۲).

علایم بالینی در دیابت عبارت از پر ادراری (Polyuria)، تشنگی مکرر (Polydipsia) و بیدار شدن در شب برای دفع ادرار (Nucturia) می‌باشند. از عوارض دیابت، می‌توان به طیفی از مشکلات عروق خونی بزرگ (Macro vascular) شامل مشکلات قلبی- عروقی، کلیوی و مشکلات عروق خونی کوچک (Micro vascular) شامل رتینوپاتی، نفروپاتی و مشکلات پا مثل زخم دیابتی اشاره کرد (۱۱).

مقاومت انسولینی پریفرال (Peripheral insulin resistant)، مکانیسم مرکزی ایجاد بیماری در کبد چرب غیر الکلی و دیابت ملیتوس نوع ۲ است و همچنین، کبد چرب غیر الکلی و دیابت ملیتوس نوع ۲، به طور زیادی وابسته به ژنتیک و رژیم غذایی هستند و این دو بیماری بسیار در جمعیت ایرانی شایع هستند (۱۳).

مطالعات مقطعی (Cross sectional studies)، دیابت ملیتوس نوع ۲ را با ایجاد هیستولوژی بدتر در کبد چرب غیر الکلی و همچنین، احتمال ایجاد خطر بالاتر پیشرفت و تهاجمی‌تر شدن بیماری مرتبط دانسته‌اند (۱۴). همچنین، شواهد بسیاری پیشنهاد می‌کند که بیماران دارای دیابت ملیتوس، در معرض افزایش خطر ایجاد حالات پیشرفت کننده‌ی کبد چرب غیر الکلی مثل NASH هستند (۱) و در نتیجه، دچار سیروز می‌شوند و میزان مرگ و میر افراد دچار سیروز، ۲ برابر جمعیت عادی است (۱۳).

مرات و همکاران، طی مطالعه‌ی در بیمارستان شریعتی تهران با بررسی شیوع کبد چرب در بین افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ و ارتباط آن با مقاومت به انسولین، دریافتند که شیوع کبد چرب غیر الکلی در بین مبتلایان به دیابت ملیتوس نوع ۲ بالا می‌باشد، اما به نظر می‌رسد مقاومت به انسولین در این مطالعه، نقشی در بروز کبد چرب غیر الکلی در این بیماران نداشته است (۱۳). با توجه به این که مطالعه‌ای در ایران در زمینه‌ی میزان شیوع دیابت و پره‌دیابت در بیماران دارای کبد چرب غیر الکلی انجام نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی شیوع دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی انجام شد تا نتایج آن به مسؤولان بهداشتی- درمانی ارایه گردد و در جهت پیش‌گیری از ایجاد دیابت و پره‌دیابت در بیماران دچار کبد چرب غیر الکلی و یا جلوگیری از پیشرفت بیماری در مبتلایان به دیابت و همچنین، پیش‌گیری از ایجاد عوارض پیش‌رونده‌ی کبد چرب غیر الکلی مانند سیروز، تا حد امکان تمهیدات لازم اندیشیده شود.

روش‌ها

این مطالعه، یک مطالعه‌ی مورد- شاهدی بود. گروه مورد شامل ۸۰ بیمار مبتلا به کبد چرب غیر الکلی (تشخیص قطعی با استفاده از سونوگرافی) مراجعه کننده به درمانگاه‌های ویژه‌ی بیمارستان‌های

آموزشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه شاهد، شامل ۲۶ فرد سالم بود که از نظر سن و جنس با بیماران همسان‌سازی شده بودند.

معیارهای ورود شامل بیماران با تشخیص قطعی کبد چرب غیر الکلی با استفاده از سونوگرافی و دارای رضایت‌نامه‌ی کتبی جهت شرکت در مطالعه بودند. معیارهای خروج شامل عدم رضایت به ورود به مطالعه و یا ادامه‌ی همکاری، مصرف الکل و وجود بیماری‌های دیگری به غیر از کبد چرب غیر الکلی و دیابت مثل سرطان بودند.

پس از مراجعه‌ی بیماران به درمانگاه، افرادی که دارای پرونده‌ی پزشکی و تشخیص قطعی کبد چرب غیر الکلی با استفاده از سونوگرافی بودند، انتخاب شدند و این گردآوری بیماران تا پر شدن حجم نمونه به طور تصادفی ادامه داشت. از هر فرد، ۵ سی‌سی خون دریافت و به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل شد و مورد آنالیز قرار گرفت.

در این مطالعه، متغیرهایی از جمله فراوانی نسبی دیابت و پره‌دیابت و میانگین انسولین، کلسترول، FBS، HbA1c، AST، ALT، Low density lipoprotein (LDL)، High density lipoprotein (HDL)، Triglyceride (TG)، 2 hour post prandial blood sugar (BS2hpp) و Body mass index (BMI) (واحد هر یک از متغیرها در جدول متغیرها ذکر شده است) و نیز میزان فعالیت بدنی بر اساس رتبه‌بندی کافی (۵-۴ روز در هفته، روزانه به مدت حداقل ۳۰ دقیقه) و کم (یک روز در هفته یا به فاصله‌ی بیش از یک هفته بدون در نظر گرفتن مدت فعالیت)، مصرف میوه و سبزیجات بر اساس رتبه‌بندی کافی (یک لیوان آب سبزی یا آب میوه در روز) و کم (عدم مصرف میوه و سبزی در روز) و مصرف ماهی بر اساس رتبه‌بندی کافی (یک بار در هفته) و کم (مصرف ماهی به طور نامنظم و با فاصله‌ی زمانی بیش از یک هفته) در بیماران اندازه‌گیری شد.

داده‌های کمی بر اساس میانگین و انحراف معیار و داده‌های کیفی بر اساس فراوانی و درصد ارایه شد. داده‌های کمی با استفاده از آزمون t و داده‌های کیفی با استفاده از آزمون χ^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در صورت نیاز، از آزمون‌های Multivariate مانند انواع رگرسیون استفاده شد. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی فراوانی دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و مقایسه با گروه شاهد انجام شد. از تعداد ۱۰۶ فرد مورد مطالعه، ۸۰ نفر (۷۵/۴ درصد) در گروه مورد و ۲۶ نفر (۲۴/۵ درصد) در گروه شاهد بودند. ۶۴ نفر (۶۰/۳ درصد) زن و ۴۲ نفر (۳۹/۷ درصد) مرد بودند که میانگین سنی افراد در گروه مورد، ۱۰/۸ ± ۴۸/۸ سال و در گروه شاهد، ۱۳/۴ ± ۴۲/۳ سال بود. تنها تفاوت میان گروه شاهد و مورد، در متغیر HDL معنی‌دار نبود و تفاوت دیگر متغیرها معنی‌دار بود؛ به گونه‌ای که HbA1c در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد بود و میانگین آن در گروه مورد ۵/۷ و در گروه شاهد، ۴/۹ میلی‌مول بر لیتر بود ($P < ۰/۰۰۱$).

همچنین، کلسترول در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد بود و میانگین آن در گروه مورد ۲۰۰/۸ و در گروه شاهد ۱۷۴/۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود ($P = ۰/۰۰۱$). LDL در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد بود و میانگین آن در گروه مورد ۱۱۵ و در گروه شاهد ۹۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود ($P = ۰/۰۱۵$).

TG در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد بود و میانگین آن در گروه مورد ۱۸۴/۳ و در گروه شاهد ۱۲۵/۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود ($P = ۰/۰۰۴$). میانگین AST در گروه مورد (۳۲/۲ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) بالاتر از گروه شاهد (۲۰/۸ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) بود ($P = ۰/۰۰۱$).

همچنین، میانگین قند ۲ ساعته در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد و به ترتیب ۱۳۵/۴ و ۱۲۱/۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود ($P = ۰/۰۰۴$).

BMI در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد بود؛ به گونه‌ای که در گروه مورد ۲۸/۶ و در گروه شاهد ۲۵/۰ کیلوگرم بر مترمربع بود ($P < ۰/۰۰۱$). میانگین قند خون ناشتا در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد و به ترتیب ۱۰۳/۱ و ۸۹/۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود ($P < ۰/۰۰۱$).

از طرفی، انسولین در گروه مورد بالاتر از گروه شاهد بود و میانگین آن در گروه مورد، ۱۹/۷ و در گروه شاهد ۸/۵ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر بود ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین، ALT در گروه مورد (۴۴/۲ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) بالاتر از گروه شاهد (۱۹/۶ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) بود؛ این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$) (جدول ۱).

از کل افراد مورد مطالعه، ۴۴ نفر (۴۱/۵ درصد) مبتلا به پره‌دیابت و ۱۱ نفر (۱۰/۴ درصد) مبتلا به دیابت بودند که همگی در گروه مورد بودند و در گروه شاهد، هیچ فردی مبتلا به پره‌دیابت ($P < ۰/۰۰۱$) یا دیابت ($P = ۰/۰۴۶$) نبود (جدول ۲).

همچنین، با حذف BMI به عنوان یک عامل مخدوش‌گر، تنها هموگلوبین A1c، قند خون ناشتا، انسولین و ALT تفاوت معنی‌داری میان دو گروه نشان دادند.

بحث

کبد چرب غیر الکلی، یک طیف وسیع از وضعیت آسیب‌های بالینی

است که با رسوب چربی در پارانشیم کبد در بیمارانی که الکل مصرف نکرده‌اند، شناخته می‌شود (۱). کبد چرب غیر الکلی، شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی در کشورهای صنعتی غربی است و شیوع آن، ۴۰-۲۰ درصد جمعیت عمومی می‌باشد (۲). شیوع کبد چرب غیر الکلی در مردان، افراد مسن و کسانی که دارای فشار خون بالا، چاقی و دیابت هستند، افزایش می‌یابد (۳). پاتوژنز کبد چرب غیر الکلی به طور قطعی مشخص نشده است، اما بیشترین و گسترده‌ترین تئوری که حمایت می‌شود، مکانیسم مقاومت به انسولین است که باعث Hepatic Steatosis می‌گردد (۴). از این رو، هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی فراوانی نسبی دیابت و پره‌دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و مقایسه‌ی آن با گروه شاهد می‌باشد.

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار متغیرهای آزمایشگاهی و سن در گروه‌های مورد (n = ۸۰) و شاهد (n = ۲۶)

متغیر	گروه	میانگین ± انحراف معیار	مقدار P
سن (سال)	مورد	۴۸/۸ ± ۱۰/۸	۰/۰۳۲
	شاهد	۴۲/۳ ± ۱۳/۴	
HbA1c (mmol/lit)	مورد	۵/۷ ± ۰/۷۲	< ۰/۰۰۱
	شاهد	۴/۹ ± ۰/۶۸	
کلسترول (mg/dl)	مورد	۲۰۰/۸ ± ۳۷/۶	۰/۰۰۱
	شاهد	۱۷۴/۴ ± ۲۸/۲	
LDL (mg/dl)	مورد	۱۱۵/۰ ± ۳۱/۰	۰/۰۱۵
	شاهد	۹۷/۷ ± ۲۹/۸	
HDL (mg/dl)	مورد	۴۷/۰ ± ۱۱/۰	۰/۴۹۷
	شاهد	۴۵/۲ ± ۱۱/۳	
TG (mg/dl)	مورد	۱۸۴/۳ ± ۱۰۵/۹	۰/۰۰۴
	شاهد	۱۲۵/۲ ± ۷۹/۱	
AST (IU/ml)	مورد	۳۲/۲ ± ۱۶/۳	۰/۰۰۱
	شاهد	۲۰/۸ ± ۸/۳	
قند ۲ ساعت بعد از ناشتا (BS2hpp) (mg/dl)	مورد	۱۳۵/۳ ± ۳۰/۹	۰/۰۲۸
	شاهد	۱۲۱/۲ ± ۱۶/۳	
BMI (kg/m^2)	مورد	۲۸/۶ ± ۳/۶	< ۰/۰۰۱
	شاهد	۲۵/۰ ± ۳/۵	
FBS (mg/dl)	مورد	۱۰۳/۱ ± ۱۷/۶	< ۰/۰۰۱
	شاهد	۸۹/۳ ± ۱۱/۵	
انسولین (IU/ml)	مورد	۱۹/۷ ± ۲۶/۲	< ۰/۰۰۱
	شاهد	۸/۵ ± ۲/۵	
ALT (IU/ml)	مورد	۴۴/۲ ± ۳۰/۱	< ۰/۰۰۱
	شاهد	۱۹/۶ ± ۹/۲	
25(OH)D (ng/ml)	مورد	۲۹/۲ ± ۳۰/۱	۰/۲۶۴
	شاهد	۲۸/۶ ± ۲۵/۶	

HbA1c: Glycated hemoglobin; LDL: Low density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein; TG: Triglyceride; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; FBS: Fast blood sugar; BMI: Body mass index; BS2hpp: 2 hour post prandial blood sugar; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D

جدول ۲. فراوانی متغیرهای کیفی مورد بررسی در دو گروه مورد و شاهد

متغیر	گروه	مورد تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	مقدار P
پره‌دیابت	دارد	۴۴ (۵۵/۰)	۰ (۰)	< ۰/۰۰۱
	ندارد	۳۶ (۴۵/۰)	۲۶ (۱۰۰)	
دیابت	دارد	۱۱ (۱۳/۸)	۰ (۰)	۰/۰۴۶
	ندارد	۶۹ (۸۶/۲)	۲۶ (۱۰۰)	
مصرف ماهی	کم	۶۲ (۷۷/۵)	۱۶ (۶۱/۵)	۰/۱۰۹
	کافی	۱۸ (۲۲/۵)	۱۰ (۳۸/۵)	
مصرف میوه و سبزیجات	دارد	۵۱ (۶۳/۸)	۱۷ (۶۵/۴)	۰/۰۶۸
	ندارد	۲۹ (۳۶/۲)	۹ (۳۴/۶)	
میزان فعالیت فیزیکی	کم	۶۱ (۷۶/۲)	۱۵ (۵۷/۷)	۰/۵۷۸
	کافی	۱۹ (۲۳/۸)	۱۱ (۴۲/۳)	

اکثر مطالعات انجام شده در خصوص رابطه و شیوع دیابت و کبد چرب غیر الکلی به بیان این مسأله پرداختند که بیماران مبتلا به دیابت، نسبت به دیگر افراد جامعه بیشتر مبتلا به کبد چرب غیر الکلی می‌شوند، اما در مطالعه‌ی حاضر، به بررسی شیوع دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی پرداخته شد که در این زمینه مطالعات اندکی وجود دارد. در مطالعه‌ی Willner و همکاران با بررسی رابطه‌ی NASH با میزان مقاومت به انسولین، مشاهده شد که ۸۵ درصد بیماران مبتلا به NASH در شرایط پره‌دیابت بودند که با گذشت زمان، اغلب این افراد مبتلا به دیابت خواهند شد که این عدد در مطالعه‌ی حاضر ۵۵ درصد و بسیار کمتر از مطالعه‌ی Willner و همکاران به دست آمد (۱۵).

Musso و همکاران در یک مطالعه‌ی سیستماتیک و متاآنالیز به منظور بررسی کبد چرب غیر الکلی، به ۴۰ مقاله‌ی مرتبط با پاتوفیزیولوژی کبد چرب غیر الکلی و ۳۲ مقاله‌ی مرتبط با روش‌های تشخیصی پرداخته‌اند. آنان نشان دادند که شیوع کبد چرب غیر الکلی در بین افراد مبتلا به دیابت و از طرفی، شیوع دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی، بالا می‌باشد و کبد چرب غیر الکلی، یک عامل خطر برای ابتلا به دیابت می‌باشد. در این مطالعه، با بررسی ۷۲ مقاله، مشخص شد که خطر ابتلا به دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی ۲ برابر بیشتر از افراد دیگر جامعه است که علت این واقعه در این مطالعه، بیشتر به خاطر افزایش مقاومت به انسولین و افزایش آنزیم‌های کبدی بیان شده است (۱۶).

حسین پناه و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که در مجموع از ۷۶ بیمار مبتلا به دیابت مورد مطالعه، ۶۳ بیمار (۸۲/۹ درصد) مبتلا به استئاتوز کبدی بودند. متوسط شاخص توده‌ی بدنی در مبتلایان به استئاتوزیس ۴/۵ ± ۲۹/۴ کیلوگرم بر مترمربع و در غیر مبتلایان ۳/۸ ± ۲۴/۸ کیلوگرم بر مترمربع بود که این اختلاف، از لحاظ آماری معنی‌دار بود. دورکمر، تری‌گلیسرید و BMI بین دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار بود (۱۷).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سندرم متابولیک با افزایش شیوع Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) مرتبط است، هر چند سیر دقیق وقایعی که منجر به بروز NAFLD می‌شوند، هنوز شناخته نشده‌اند. سندرم متابولیک با مجموعه‌ای از عوامل خطر عمده‌ی قلبی- عروقی در حضور مقاومت به انسولین شناخته می‌شود. مقاومت به انسولین، مسؤول ایجاد اختلال ذخیره‌ی چربی و لیپولیز در بافت‌های حساس به انسولین است که موجب افزایش جریان اسیدهای چرب از بافت چربی به کبد و ایجاد استئاتوز می‌شود. علاوه بر این، مقاومت به انسولین، باعث پراکسیداسیون چربی می‌شود که خود باعث فعال شدن سیتوکاین های التهابی و تسهیل پیشرفت استئاتوز ساده به سمت استئاتوهپاتیت غیر الکلی و فیبروز کبدی می‌شود (۱۸).

مطالعات گذشته‌نگر متعددی جنس مؤنث، چاقی، هایپرگلیسمی و هایپرلیپیدمی را به عنوان عوامل خطر بیماری کبد چرب غیر الکلی معرفی کرده‌اند. عوامل خطر شناخته شده‌ی این بیماری شامل تغذیه‌ی کامل وریدی، سوء تغذیه‌ی پروتئین- کالری، بای‌پس ژژنوایلئال و گروهی از داروها می‌باشند (۱۹، ۴).

Bacon و همکاران بیان کردند که بیماری کبد چرب غیر الکلی، می‌تواند در بسیاری از افراد بدون عامل خطر شناخته شده ایجاد شود (۵)؛ اما در نهایت، NAFLD با چاقی و افزایش مقاومت به انسولین به عنوان دو عامل خطر شناخته شده‌ی قوی مرتبط است (۲۱-۲۰). شیوع بالای NAFLD و ناکافی بودن اطلاعات در زمینه‌ی سیر طبیعی آن، باعث اختلاف نظر در توصیه به انجام روش‌های تشخیصی

تهاجمی یا اقدام به ابداع روش‌های درمانی جدید شده است. تلاش‌ها برای پیش‌گیری یا درمان NAFLD به دلیل فقدان اطلاعات کافی در مورد پاتوژنز بیماری بسیار محدود هستند، اما به هر حال، اتیولوژی‌های بیماری به دو دسته‌ی کلی داروها و سموم و نیز اختلالات متابولیک تقسیم‌بندی می‌شوند، هر چند NAFLD به عنوان طیفی از بیماری‌های کبدی با ماهیت چند عاملی شناخته می‌شود.

در مطالعه ی حاضر، استئاتوز کبدی به کمک سونوگرافی مورد ارزیابی قرار گرفت که حساسیت و اختصاصیت آن در مقایسه با معیار بافت‌شناختی به عنوان استاندارد طلایی به ترتیب ۸۳ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۲۳-۲۲).

در این پژوهش، عوامل خطر مطرح شده برای استئاتوز کبدی (قند خون ناشتا، شاخص توده‌ی بدنی، سطح پلاسمایی تری‌گلیسرید، کلسترول تام، آنزیم‌های کبدی و HbA1c) با حذف عوامل مخدوش‌گر مورد بررسی قرار گرفت که پس از حذف سن به عنوان یک عامل مخدوش‌گر، تنها متغیرهایی که هنوز تفاوت معنی‌داری میان دو گروه داشتند و در گروه مورد بیشتر بودند، شامل HbA1c، قند خون ناشتا، انسولین، کلسترول، AST، ALT و قند خون دو ساعته می‌باشند. همچنین، با حذف BMI به عنوان یک عامل مخدوش‌گر، تنها HbA1c، قند خون ناشتا، انسولین و ALT تفاوت معنی‌داری میان دو گروه نشان دادند که این عوامل با وجود استئاتوزیس ارتباط نشان دادند. این نتایج، نشان می‌دهد که شیوع دیابت در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی، بالا می‌باشد و حتی با حذف عوامل مخدوش‌گر، عوامل مرتبط با دیابت مانند HbA1c، قند خون ناشتا و انسولین ارتباط معنی‌داری داشتند که نشان دهنده‌ی ارتباط محکم میان این دو بیماری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای نیما عباسی ولدانی به شماره‌ی ۲۹۲۲۶۲ مصوب حوزه‌ی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که با حمایت‌های معنوی و مادی این معاونت به انجام رسید. بدین وسیله از زحمات این عزیزان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. Clin Gastroenterol Hepatol 2004; 2(3): 262-5.
2. Chitturi S, Farrell GC, Hashimoto E, Saibara T, Lau GK, Sollano JD. Non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: definitions and overview of proposed guidelines. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22(6): 778-87.
3. Amarapurkar DN, Hashimoto E, Lesmana LA, Sollano JD, Chen PJ, Goh KL. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? J Gastroenterol Hepatol 2007; 22(6): 788-93.
4. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. Ann Intern Med 1997; 126(2): 137-45.
5. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. Gastroenterology 1994; 107(4): 1103-9.
6. Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. J Gastroenterol Hepatol 2002; 17(11): 1136-43.
7. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. Hepatology 2002; 35(4): 746-52.
8. Islam MR, Arslan I, Attia J, McEvoy M, McElduff P, Basher A, et al. Is serum zinc level associated with prediabetes and diabetes?: a cross-sectional study from Bangladesh. PLoS One 2013; 8(4): e61776.
9. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27(5): 1047-53.
10. Beletate V, El Dib RP, Atallah AN. Zinc supplementation for the prevention of type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev 2007; (1): CD005525.
11. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2011; 34(Suppl 1): S62-S69.
12. Atkinson MA, Maclaren NK. The Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. N Engl J Med 1994; 331(21): 1428-36.
13. Merat S, Yarahmadi S, Tahaghoghi S, Alizadeh Z, Sedighi N, Mansournia N, et al. Prevalence of fatty liver disease among type 2 diabetes mellitus patients and its relation to insulin resistance. Middle East J Dig Dis 2009; 1(2): 74-9.
14. Ortiz-Lopez C, Lomonaco R, Orsak B, Finch J, Chang Z, Kochunov VG, et al. Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Diabetes Care 2012; 35(4): 873-8.
15. Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. Am J Gastroenterol 2001; 96(10): 2957-61.
16. Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. Diabetologia 2012; 55(4): 885-904.

17. Hossein Panah F, Sadeghi L, Rambod M, Foroutan M, Naseri M. Assessing predicting factors in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in type 2 diabetes. Pajouhesh Dar Pezeshki 2006; 30(10): 9-15. [In Persian].
18. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology 1998; 114(4): 842-5.
19. Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005; 2(1): 46-53.
20. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology 1999; 116(6): 1413-9.
21. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med 2002; 346(16): 1221-31.
22. Osawa H, Mori Y. Sonographic diagnosis of fatty liver using a histogram echnique that compares liver and renal cortical echo amplitudes. J Clin Ultrasound 1996; 24(1): 25-9.
23. Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. Br Med J (Clin Res Ed) 1986; 292(6512): 13-5.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 03.11.2015
Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016
Accepted: 04.02.2016

Determination of Frequency of Diabetes and Pre-Diabetes in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Comparison with a Control Group

Bahram Pakzad MD[1], Nima Abbasi-Veldani[2], Mojtaba Akbari MSc[3]

Original Article

Abstract

Background: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease in Western industrialized countries. The pathogenesis of NAFLD has not been clearly determined, but the most widely supported theory is the mechanism of insulin resistance. Therefore, the aim of this study was to evaluate the frequency of diabetes and pre-diabetes in patients with NAFLD.

Methods: The present study was performed on 80 patients and 26 healthy controls matched for age and sex. Patients were diagnosed with NAFLD through ultrasound and were selected. From each participant, a 5 cc sample of blood was obtained and sent to a pathology laboratory for analysis. Quantitative data and qualitative data were analyzed using t-test and chi-square test, respectively. Moreover, multivariate tests, such as regression tests, were used where necessary.

Findings: Among the participants, 64 (60.3%) were women and 42 (39.7%) were men. The average age of the subjects in the case group was 48.8 ± 10.8 years and in the control group was 42.3 ± 13.4 years. Of the 106 participants, 44 patients (41.5%) had pre-diabetes and 11 (10.4%) had diabetes; all were in the case group. In the control group, no subjects had pre-diabetes ($P < 0.001$) or diabetes ($P = 0.046$). After removing age as a confounder, the only variables that differed significantly between the two groups and were higher in the case group were hemoglobin A1c (HbA1c), fasting plasma glucose, insulin, cholesterol, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), two-hour blood glucose. Moreover, with the removal of BMI as a confounder, only hemoglobin A1C, fasting blood glucose, insulin, and ALT showed significant differences between the two groups.

Conclusion: This study showed that the prevalence of diabetes in patients with NAFLD was high. Even with the removal of confounding factors, factors associated with diabetes, such as hemoglobin A1c, fasting plasma glucose, and insulin, had significant association with this disease, indicating a strong relationship between the two diseases.

Keywords: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), Diabetes, Pre-diabetes

Citation: Pakzad B, Abbasi-Veldani N, Akbari M. **Determination of Frequency of Diabetes and Pre-Diabetes in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Comparison with a Control Group.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2440-7

1- Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Department of Epidemiology, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Nima Abbasi-Veldani, Email: nima.abbasi69@yahoo.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۵

تأثیر پروبیوتیک در درمان یبوست عملکردی کودکان ۱۲-۴ سال

دکتر معصومه عابدینی[۱]، دکتر پدرام عطایی[۱]، دکتر عبدالرحیم افخم‌زاده[۲]، دکتر مریم سیف منش[۳]، دکتر بنفشه صداقت[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یبوست عملکردی، یک مشکل شایع و آزار دهنده در دوران کودکی است و پروبیوتیک به طور فزاینده ای در درمان اختلالات عملکردی دستگاه گوارش استفاده می شود. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر پروبیوتیک در درمان یبوست عملکردی کودکان ۴ تا ۱۲ سال انجام شد.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر یک کارآزمایی بالینی بود که بر روی کودکان ۱۲-۴ ساله‌ی مبتلا به یبوست عملکردی بر اساس معیارهای Rome III، مراجعه کننده به کلینیک بیمارستان بعثت سنندج در سال ۱۳۹۲ انجام شد. معیارهای خروج شامل دریافت هر نوع مسهل زیر ۴ هفته، عقب ماندگی ذهنی، بیماری هیپوتیروئیدی، فیبروز کیستیک و جراحی روده‌ای بود. نمونه شامل ۹۰ کودک بود که به روش تصادفی ساده در یکی از دو گروه مورد یا شاهد قرار می‌گرفتند. به گروه شاهد درمان معمول یبوست ۱/۵-۰/۷ گرم بر کیلوگرم پودر پیدرولاکس به مدت ۴ هفته به صورت روزانه و به گروه مورد، درمان معمول یبوست و پروبیوتیک داده شد. بیماران ۲ هفته و ۴ هفته بعد از شروع مداخله، مورد بررسی قرار گرفتند. ارزیابی اولیه شامل بررسی تعداد دفعات اجابت مزاج در هفته، قوام مدفوع، تعداد موارد بی‌اختیاری دفع در هفته، وجود درد شکم و دفع دردناک بود. ارزیابی ثانویه، بررسی درمان موفق و ایجاد عوارض جانبی مانند اسهال و استفراغ بود.

یافته‌ها: فراوانی دفع دردناک و دفع سخت در کودکان گروه مورد با گروه شاهد در قبل، ۲ و ۴ هفته بعد از مداخله تفاوت معنی‌دار آماری نداشت ($P > ۰/۰۵$)، اما دو گروه از نظر درد شکم در ۲ و ۴ هفته بعد از مداخله تفاوت معنی‌دار آماری داشتند ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده و بدون عارضه بودن پروبیوتیک‌ها، اضافه کردن آن به درمان استاندارد یبوست عملکردی در کودکان مبتلا، می‌تواند مفید باشد.

واژگان کلیدی: یبوست عملکردی، پروبیو تیک، کودکان

ارجاع: عابدینی معصومه، عطایی پدرام، افخم‌زاده عبدالرحیم، سیف منش مریم، صداقت بنفشه. **تأثیر پروبیوتیک در درمان یبوست عملکردی کودکان ۱۲-۴ سال.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۵۴-۲۴۴۸

مقدمه

یبوست، یک شکایت شایع در اطفال است و در جمعیت عمومی، شیوع ۲۹/۹-۰/۷ درصد دارد (۱). هر تعریفی از یبوست نسبی است و به قوام مدفوع، دفعات دفع و مشکل در دفع مدفوع بستگی دارد. یک کودک طبیعی، ممکن است هر ۳-۲ روز یک بار دفع مدفوع نرم و بدون مشکل داشته باشد. دفع مدفوع سفت هر ۳ روز یک بار که به سختی صورت می‌گیرد، باید درمان شود (۲).

یبوست، در اکثر (۹۵-۹۰ درصد) موارد، فاقد علت ارگانیک و اغلب عملکردی است که به واسطه‌ی وجود این موارد تعریف می‌شود. معیارهای Rome III در کودکان بالای ۴ سال شامل دفع کمتر از ۳ بار در هفته، ۱ بار یا بیشتر بی‌اختیاری در دفع در هفته، عبور مدفوع سفت و بزرگ که دهانه‌ی توالت را مسدود کند، وضعیت احتباسی به خود گرفتن و وجود توده‌ی بزرگ مدفوع در رکتوم در معاینه می‌باشد. در شرح حال دفع دردناک، درمان استاندارد شامل آموزش بیمار در جهت نگه نداشتن مدفوع و مصرف لاکساتیو است؛ به طوری که دفع مدفوع نرم و بدون مشکل شود. هر چند درمان‌های سنتی تأثیر گذارند، اما با این حال، در بسیاری بیماران بهبودی ایجاد نمی‌کنند و رویکرد به سمت سایر درمان‌ها بوده است (۳). درمان نگهدارنده تا زمان برقراری الگوی دفع طبیعی و رفع درد همراه با دفع مدفوع، ادامه می‌یابد (۲).

پروبیوتیک‌ها به عنوان درمان جایگزین به طور فزاینده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های غیر بیماری‌زای

۱- استادیار، گروه کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۲- استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۳- دستیار، گروه کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بنفشه صداقت
Email: bani.2010@yahoo.com

زنده‌ای هستند که در روده رشد می‌کنند و میکرو فلورای روده را تنظیم می‌نمایند. فعالیت‌های متابولیک این میکروارگانیسم‌ها، اثرات مفیدی برای میزبان دارند. در مطالعات اخیر، تأثیر پروبیوتیک در درمان یبوست عملکردی کودکان اثبات شده است (۴).

این مطالعات نشان داده است که این امر با واسطه‌ی کاهش pH کلون رخ می‌دهد؛ که این کاهش، در نتیجه‌ی تولید محصولات باکتریایی (اسیدهای چرب زنجیره‌ی کوتاه) بوده است. همچنین، پروبیوتیک در کاهش علایم بیماری‌های التهابی روده، درمان درماتیت اتوپیک، درمان اسهال همراه با مصرف آنتی‌بیوتیک و اسهال ویروسی حاد مؤثر است. اثرات سوء پروبیوتیک نادر است و هیچ تداخل دارویی ندارد (۵-۴). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از پروبیوتیک‌ها در اشخاص سالم خطر بیماری‌های باکتریایی را افزایش نمی‌دهد؛ همچنین، در بیماران دچار نقص ایمنی، این خطر بسیار پایین است (۶).

پروبیوتیک‌های اصلی شامل Lactobacillus plantarum، Lactobacillus casei، Lactobacillus paracasei، Lactobacillus rhamnosus و Lactobacillus reuteri) و Bifidobacterium (Bifidobacterium infantis، Bifidobacterium breve، Bifidobacterium bifidum، Bifidobacterium adolescentis، Bifidobacterium longum و Bifidobacterium lactis) و Saccharomyces boulardii و Propionibacterium freudenreichii می‌باشد.

مطالعات جدید در ایران و کشورهای توسعه یافته، به تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها در درمان یبوست اشاره کرده‌اند. یبوست، تأثیر سیستمیک عضوی زیانباری ندارد، اما در موارد شدید و طولانی می‌تواند استاز دستگاه ادراری، بی‌اختیاری مدفوع، درد شکم، درد رکتوم، بی‌اشتهایی و همچنین اضطراب ایجاد نماید و تأثیر هیجانی قابل ملاحظه‌ای بر بیمار و خانواده داشته باشد (۲).

با توجه به مطالعات انجام گرفته و اثرات یبوست بر بیماران، در این پژوهش تأثیر پروبیوتیک‌ها به عنوان یک عامل بی‌خطر و مفید در کاهش دفعات و شدت یبوست در کودکان مراجعه کننده به کلینیک بیمارستان بعثت سنندج بررسی شد، با این تفاوت که اکثر مطالعات که انجام گرفته در گروه سنی ۱۶-۲ سال و مطالعه‌ی حاضر در گروه سنی ۱۲-۴ سال انجام شده.

روش‌ها

این مطالعه به روش کارآزمایی بالینی یک سو کور بر روی کودکان مراجعه کننده به کلینیک بیمارستان بعثت سنندج در سال ۱۳۹۲ انجام گرفت. معیارهای ورود شامل سن ۱۲-۴ سال و ابتلا به یبوست عملکردی (داشتن حداقل ۲ مورد از ۶ معیار Rome III) بود. دریافت مسهل در ۴ هفته‌ی قبل، عقب ماندگی ذهنی، ابتلا به هیپوتیروئیدی و فیبروز کیستیک و نیز داشتن جراحی روده‌ای، معیارهای خروج کودکان از مطالعه بودند.

۹۰ کودک به روش تصادفی ساده در دو گروه مورد و شاهد انتخاب شدند. برای هر کودک، ابتدا چک لیستی حاوی اطلاعاتی از قبیل نام و نام خانوادگی، سن، جنس، سابقه‌ی بیماری‌های قبلی، مدت یبوست، دفعات دفع سخت در هفته، دفعات درد شکم در هفته، وجود توده‌ی بزرگ در لمس در رکتوم و وجود شرح حال دفع مدفوع بزرگ، تکمیل شد.

برای اجرای مداخله، پس اخذ شرح حال و معاینه‌ی بالینی، به والدین هر یک از کودکان توضیحات لازم در خصوص چگونگی درمان کودکان بر اساس قرار گرفتن در گروه مورد یا شاهد داده شد.

کودکان گروه شاهد، درمان معمول یبوست شامل ۱/۵-۰/۷ گرم بر کیلوگرم پودر پیدرولاکس (کیدی لاکت از شرکت فراورده‌های مکمل زیست تخمیر) به مدت ۴ هفته به صورت روزانه دریافت کردند. کودکان گروه مورد، علاوه بر درمان معمول یبوست، پروبیوتیک (کیدی لاکت) به مدت ۴ هفته، روزانه ۲-۱ ساشه (بر حسب وزن بیمار) به صورت محلول در آب، آبمیوه یا شیر و یا به صورت مخلوط با غذا دریافت کردند.

کیدی لاکت (Kidi lact)، از شرکت فراورده‌های مکمل زیست تخمیر و یک ترکیب ویژه‌ی پروبیوتیک برای کودکان بالای ۲ سال است که حاوی مقادیر بالایی از ۷ سویه‌ی باکتری Lactobacillus casei) Lactobacillus ۱۰۱۰ × ۳، cfu/g Lactobacillus Acidophilus ۱۰۱۰ × ۲، Lactobacillus rhamnosus ۱۰۱۰ × ۳ و cfu/g Lactobacillus bulgaricus ۱۰۹ × ۲، cfu/g Bifidobacterium infantis ۱۰۱۰ × ۵ و cfu/g Bifidobacterium breve ۱۰۱۰ × ۲ و همچنین Streptococcus thermophiles ۱۰۹ × ۲) به همراه Fructooligosaccharides (کمک کننده به رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها) می‌باشد و فرمول آن ویژه‌ی کودکان تهیه شده است تا آن را به آسانی مصرف کنند.

مصرف روزانه‌ی پودر پیدرولاکس و پروبیوتیک توسط کودکان با تماس تلفنی دستیار کودکان در مدت ۴ هفته مطالعه پی‌گیری شد. بیماران در ۲ و ۴ هفته بعد از شروع مداخله، مورد معاینه‌ی بالینی قرار گرفتند. این ارزیابی اولیه شامل قوام مدفوع، تعداد موارد بی‌اختیاری دفع در هفته، وجود درد شکم و دفع دردناک بود. ارزیابی ثانویه شامل بررسی درمان موفق و ایجاد عوارض جانبی مانند اسهال و استفراغ بود.

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل شد. برای بررسی رابطه‌ی متغیرهای کیفی، از آزمون‌های χ^2 و Fisher's exact و برای مقایسه‌ی متغیرهای کمی در دو گروه، از آزمون t استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، میانگین سنی کودکان گروه مورد ۱/۸۹ ± ۶/۴۷ و گروه شاهد ۲/۱۴ ± ۶/۸۷ سال بود (P = ۰/۳۵). از نظر مدت ابتلا نیز دو گروه مورد و شاهد (۸/۱۱ ± ۱۲/۴۷ در مقایسه با ۸/۱۶ ± ۱۲/۴۰) تفاوت نداشتند (P = ۰/۹۷). همچنین، دو گروه از نظر آلرژی، آنال فیشر (Anal fissure) و سابقه‌ی درماتیت آتوپیک (Atopic dermatitis) با هم تفاوت نداشتند (جدول ۱).

فراوانی دفع دردناک در کودکان گروه مورد و شاهد در قبل، ۲ و ۴ هفته بعد از مداخله، تفاوت معنی‌دار آماری نداشت، اما فراوانی دفع دردناک بعد از ۴ هفته در گروه مورد ۱۵/۶ درصد و در گروه شاهد ۳۳/۳ درصد بود (جدول ۲).

فراوانی درد شکم در هفته‌ی دوم در گروه مورد ۲۶/۷ درصد و در گروه شاهد ۵۱/۱ درصد بود (P = ۰/۰۱). در هفته‌ی چهارم نیز در گروه مورد ۱۵/۶ درصد و در گروه شاهد ۳۵/۶ درصد بود (P = ۰/۰۳) (جدول ۳).

بین دو گروه از نظر دفع سخت در ۲ و ۴ هفته بعد از شروع مورد تفاوت معنی‌دار آماری وجود نداشت (P > ۰/۰۵) (جدول ۴).

بحث

مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها به طور دقیق مشخص نیست، اما بعضی از فرضیات در خصوص نحوه‌ی تأثیر آن‌ها وجود دارد. در مرحله‌ی اول، بر هم خوردن توازن در فلور روده در بیماران مبتلا به یبوست می‌شود، بر هم خوردن توازن در فلور روده، تظاهر ثانویه‌ی یبوست و یک عامل خطر برای یبوست است. علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها می‌توانند pH روده‌ی بزرگ را با تولید اسید لاکتیک و اسید استیک و دیگر اسیدهای چرب پایین آورند. pH پایین، باعث افزایش حرکات دودی روده و به دنبال آن، کاهش زمان انتقال کولونی می‌گردد (۸-۷).

جدول ۱. مقایسه‌ی متغیرها در بیماران گروه مورد و شاهد

متغیر	گروه	مورد	شاهد	مقدار P
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
جنس	پسر	۱۸ (۶۰/۰)	۳۲ (۷۱/۱)	< ۰/۰۱
	دختر	۲۷ (۴۰/۰)	۱۳ (۲۸/۹)	
سابقه‌ی آلرژی	بلی	۲۴ (۵۳/۳)	۲۷ (۶۰/۰)	۰/۵۲
	خیر	۲۱ (۴۶/۷)	۱۸ (۴۰/۰)	
سابقه‌ی آنال فیشر	بلی	۱۱ (۲۴/۴)	۱۰ (۲۲/۲)	۰/۸۰
	خیر	۳۴ (۷۵/۶)	۳۵ (۷۷/۸)	
سابقه‌ی درماتیت آتوپیک	بلی	۲۵ (۵۵/۵)	۱۹ (۴۲/۲)	۰/۳۹
	خیر	۲۰ (۴۵/۵)	۱۶ (۵۷/۸)	

جدول ۲. مقایسه‌ی فراوانی دفع دردناک در بیماران گروه مورد و شاهد

دفع دردناک	گروه	مورد	شاهد	مقدار P
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
قبل از مداخله	بلی	۴۱ (۹۱/۱)	۴۰ (۸۸/۹)	*۰/۹۹
	خیر	۴ (۸/۹)	۵ (۱۱/۱)	
۲ هفته بعد از مداخله	بلی	۱۱ (۲۴/۴)	۱۹ (۴۲/۲)	**۰/۱۲
	خیر	۳۴ (۷۵/۶)	۲۶ (۵۷/۸)	
۴ هفته بعد از مداخله	بلی	۷ (۱۵/۶)	۱۵ (۳۳/۳)	**۰/۰۸
	خیر	۳۸ (۸۴/۴)	۳۰ (۶۶/۷)	

* آزمون Fisher's exact، ** آزمون χ^2

جدول ۳. مقایسه‌ی فراوانی درد شکم در بیماران دو گروه مورد و شاهد

درد شکم	گروه	مورد	شاهد	مقدار P
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
قبل از مداخله	بلی	۴۰ (۸۸/۹)	۳۸ (۸۴/۴)	۰/۷۶
	خیر	۵ (۱۱/۱)	۷ (۱۵/۶)	
۲ هفته بعد از مداخله	بلی	۱۲ (۲۶/۷)	۲۳ (۵۱/۱)	۰/۰۱
	خیر	۳۳ (۷۳/۳)	۲۲ (۴۸/۹)	
۴ هفته بعد از مداخله	بلی	۷ (۱۵/۶)	۱۶ (۳۵/۶)	۰/۰۳
	خیر	۳۸ (۸۴/۴)	۲۹ (۶۴/۴)	

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف ۷ گونه پروبیوتیک به مدت ۴ هفته، در فراوانی دفع دردناک مدفوع و دفع سخت مدفوع در کودکان گروه مورد و شاهد در قبل، ۲ و ۴ هفته بعد از مصرف، تفاوت معنی‌دار آماری نداشت، اما بین دو گروه از نظر درد شکم در ۲ و ۴ هفته بعد از مداخله، تفاوت معنی‌دار آماری وجود داشت.

در مطالعه‌ی حاضر، اگر چه فراوانی دفع دردناک مدفوع در کودکان دریافت کننده‌ی پروبیوتیک کمتر از کودکان گروه شاهد بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مطالعه‌ی Bekkali و همکاران (۳) که به منظور بررسی اثر پروبیوتیک حاوی Bifidobacterium و Lactobacillus بر درمان یبوست در ۴۰ کودک ۱۶-۴ ساله انجام شد، دفع دردناک مدفوع در ۷ کودک در شروع مطالعه، در ۴ کودک در هفته‌ی ۲ و در ۶ کودک بعد از هفته‌ی ۴ بهبود یافت، اما این یافته نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود که با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه‌ی Guerra و همکاران بر روی ۵۹ کودک ۱۹-۵ ساله که به دو گروه دریافت کننده‌ی ماست مکمل با پروبیوتیک حاوی Bifidobacterium longum و ماست تنها به مدت ۵ هفته انجام شد، نتایج نشان داد که دفع دردناک در گروه دریافت کننده‌ی ماست پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت (۹).

در مطالعه‌ای در مرکز طبی تهران، ۱۰۲ کودک ۱۲-۴ ساله‌ی مبتلا به یبوست عملکردی برای ۴ هفته ارزیابی شدند. کودکان مورد مطالعه، به ۳ گروه تقسیم شدند. به گروه اول ۱/۵ سی‌سی بر کیلوگرم در روز پارافین خوراکی همراه دارونما، به گروه دوم یک ساشه سین‌بیوتیک در روز همراه با دارونما و به گروه سوم ۱/۵ سی‌سی بر کیلوگرم در روز پارافین خوراکی همراه با یک ساشه سین‌بیوتیک داده شد. دفع دردناک در همه‌ی گروه‌ها بعد از دوره‌ی درمان کاهش یافت (۱۰).

در مطالعه‌ی حاضر، درد شکم در گروه دریافت کننده‌ی پروبیوتیک به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. درد شکم در مطالعات مشابه که کودکان مبتلا به یبوست عملکردی از پروبیوتیک استفاده کرده بودند، بهبود یافته و یا فراوانی بروز آن کاهش یافته بود؛ به طوری که در مطالعه‌ی Bekkali و همکاران (۳)، Guerra و همکاران (۹) درد شکم بهبود یافته و در مطالعه‌ی Tabbers و همکاران (۱۱)، دفعات درد شکم از ۴/۲ بار در ابتدای مطالعه، به ۱/۹ در هفته‌ی چهارم کاهش یافته بود که یافته‌های آنان با نتایج مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارند.

در مطالعه‌ی Banaszkiewicz و Szajewska، که بر روی ۸۴ کودک ۱۶-۲ ساله انجام شده بود، گروه مورد ۱ میلی‌لیتر/کیلوگرم در روز از لاکتولوز ۷۰ درصد به علاوه‌ی 10^9 cfu از Lactobacillus casei rhamnosus GG و گروه شاهد یک دارونما حاوی لاکتولوز به صورت خوراکی دو بار در روز به مدت ۱۲ هفته دریافت کردند. دو گروه در دوره‌ی دفع سخت در هفته‌های چهارم، هشتم و دوازدهم تفاوت نداشتند (۱۲). این بررسی از نظر دفع سخت، با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد.

جدول ۴. مقایسه‌ی فراوانی دفع سخت در بیماران گروه مورد و شاهد

دفع سخت	گروه	مورد	شاهد	مقدار P
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
قبل از مداخله	بلی	۳۸ (۸۴/۴)	۳۹ (۸۶/۷)	۰/۷۴
	خیر	۷ (۱۵/۶)	۶ (۱۳/۳)	
۲ هفته بعد از مداخله	بلی	۱۱ (۲۴/۴)	۱۱ (۲۴/۴)	۰/۹۹
	خیر	۳۴ (۷۵/۶)	۳۴ (۷۵/۶)	
۴ هفته بعد از مداخله	بلی	۵ (۱۱/۱)	۸ (۱۷/۸)	۰/۳۷
	خیر	۴۰ (۸۸/۹)	۳۷ (۸۲/۲)	

در مطالعه‌ی Bu و همکاران، اثر درمان کودکان مبتلا به یبوست مزمن با Lactobacillus casei rhamnosus در مقایسه با اکسید منیزیم به عنوان دارونما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، کاهش درد شکم (۱/۹ ± ۱/۶ در مقابل ۳/۳ ± ۶/۷) و کاهش درصد دفع سخت مدفوع را (۲۲/۴ ± ۱۴/۷ در مقابل ۶/۱ ± ۷۵/۵) در دو گروه نشان داد (۱۳). این مطالعه، از نظر کاهش درد شکم با مطالعه‌ی حاضر مطابقت، اما از نظر دفع سخت مغایرت داشت.

در مطالعه‌ی صانعیان و همکاران که بر روی ۶۰ کودک ۱۴-۲ ساله با یبوست عملکردی انجام شد، کودکان گروه مورد Synbiotic lactol همراه روغن معدنی و کودکان گروه شاهد روغن معدنی به تنهایی به مدت ۲ ماه دریافت کردند. فراوانی دفع سخت و دفع دردناک در هر دو گروه به طور مشابه کاهش یافته بود، اما بهبود بیشتری در گروه مورد مشاهده شد (۱۴) که تا حدود زیادی با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد.

یافته‌های بیشتر مطالعات مشابه، با نتایج این مطالعه همخوانی داشت و تفاوت در برخی یافته‌ها می‌تواند مربوط به تفاوت در جامعه‌ی کودکان مورد مطالعه، معیارهای ورود، استفاده از سویه‌های مختلف پروبیوتیک، دزهای مختلف و طول دوره‌ی درمان باشد. همچنین، ممکن است اثرات پروبیوتیک‌ها در جمعیت‌های خاص متفاوت باشد.

با توجه به اطلاعات موجود، فرض بر این است که خطر عفونت با انواع Lactobacillus یا Bifidobacterium شبیه به خطر فلور طبیعی روده است (۷)، اما این نگرانی وجود دارد که استفاده از پروبیوتیک‌ها، ممکن است در جوامع در معرض خطر مانند بیمارانی که سیستم ایمنی آن‌ها تضعیف شده، یا به دلیل بیماری‌های تهدید کننده‌ی زندگی در بخش مراقبت‌های ویژه بستری شده‌اند، سبب نتایج زیانبار شود (۸).

شواهد مطالعات غیر کارآزمایی بالینی نشان می‌دهد که برخی از پروبیوتیک‌ها ممکن است مؤثر باشند. به عنوان مثال، در کودکان مبتلا به یبوست، مصرف انواع Bifidobacterium شامل (Bifidobacterium bifidum، Bifidobacterium infantis و Bifidobacterium longum) و انواع Lactobacillus شامل (Lactobacillus casei، Lactobacillus plantarum و Lactobacillus rhamnosus) سبب افزایش حرکات روده، کاهش تعداد حملات بی‌اختیاری مدفوع و کاهش درد شکم شده است (۳).

در برخی مطالعات انجام شده، اگر چه نتایج آماری معنی‌دار بود، اما اثر بالینی پروبیوتیک‌ها معمولی بود و همه‌ی نتیجه‌گیری‌ها، مبتنی بر مطالعات منفرد بود که در برخی از آن‌ها با توجه به تعداد کم جامعه‌ی مورد مطالعه و محدودیت‌های روش مطالعه، نتایج باید با احتیاط تفسیر شود. کمبود اطلاعات در خصوص این که کدام پروبیوتیک می‌تواند مؤثرتر از دیگران باشد، وجود دارد. با توجه به این که مطالعات مربوط به مصرف پروبیوتیک‌ها اغلب توسط تولید کنندگان حمایت می‌شود، احتمال می‌رود که نتایج منفی، منتشر نشده باقی بمانند (۱۵).

در پایان، می‌توان نتیجه گرفت که بر اساس یافته‌های این مطالعه و بدون عارضه بودن پروبیوتیک‌ها، اضافه کردن آن به درمان استاندارد یبوست عملکردی در کودکان مبتلا، می‌تواند مفید باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند سپاسگزاری می گردد.

References

1. van den Berg MM, Benninga MA, Di Lorenzo C. Epidemiology of childhood constipation: a systematic review. Am J Gastroenterol 2006; 101(10): 2401-9.
2. Kliegman RM, Stanton BMD, Geme JS, Schor NF, Behrman RE. Nelson textbook of pediatrics. 19th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2011. p. 1246-7.
3. Bekkali NL, Bongers ME, van den Berg MM, Liem O, Benninga MA. The role of a probiotics mixture in the treatment of childhood constipation: a pilot study. Nutr J 2007; 6: 17.
4. Kligler B, Cohrssen A. Probiotics. Am Fam Physician 2008; 78(9): 1073-8.
5. Gill H, Prasad J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. Adv Exp Med Biol 2008; 606: 423-54.
6. Salminen MK, Rautelin H, Tynkkynen S, Poussa T, Saxelin M, Valtonen V, et al. Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. rhamnosus GG. Clin Infect Dis 2004; 38(1): 62-9.
7. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosus DR20. Appl Environ Microbiol 2000; 66(6): 2578-88.
8. Coccorullo P, Strisciuglio C, Martinelli M, Miele E, Greco L, Staiano A. Lactobacillus reuteri (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. J Pediatr 2010; 157(4): 598-602.
9. Guerra PV, Lima LN, Souza TC, Mazochi V, Penna FJ, Silva AM, et al. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. World J Gastroenterol 2011; 17(34): 3916-21.
10. Khodadad A, Sabbaghian M. Role of synbiotics in the treatment of childhood constipation: a double-

blind randomized placebo controlled trial. Iran J Pediatr 2010; 20(4): 387-92.
11. Tabbers MM, de M, I, Roseboom MG, Benninga MA. Is Bifidobacterium breve effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. Nutr J 2011; 10: 19.
12. Banaszkiewicz A, Szajewska H. Ineffectiveness of Lactobacillus GG as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. J Pediatr 2005; 146(3): 364-9.
13. Bu LN, Chang MH, Ni YH, Chen HL, Cheng CC. Lactobacillus casei rhamnosus Lcr35 in children with chronic constipation. Pediatr Int 2007; 49(4): 485-90.
14. Saneian H, Tavakkol K, Adhamian P, Gholamrezaei A. Comparison of Lactobacillus Sporogenes plus mineral oil and mineral oil alone in the treatment of childhood functional constipation. J Res Med Sci 2013; 18(2): 85-8.
15. Chmielewska A, Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. World J Gastroenterol 2010; 16(1): 69-75.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016

Received: 13.11.2015

Accepted: 04.02.2016

The Effect of Probiotics on the Treatment of Functional Constipation in Children of 4–12 Years of Age

Masoumeh Abediny MD[1], Pedram Ataiee MD[1], Abdorahim Afkhamzadeh MD[2], Maryam Seifmanesh[3], Banafsheh Sedaghat[3]

Original Article

Abstract

Background: Functional constipation in childhood is a common and frustrating problem and probiotics are increasingly used in the treatment of functional gastrointestinal disorders. This study investigated the effect of probiotics on the treatment of functional constipation in children of 4 to 12 years of age.

Methods: This clinical trial was conducted on 4 to 12-year-old children with functional constipation, according to Rome III, who referred to the clinic of Besat Hospital in Sanandaj, Iran, in 2013. The exclusion criteria included receiving any kind of laxative during the previous 4 weeks, mental retardation, hypothyroidism, cystic fibrosis, and intestinal surgery. The sample consisted of 90 children who were randomly assigned to either the intervention or the control group. The control group received routine treatment of constipation (0.7-1.5 g/kg Pidrolax powder daily) for 4 weeks and the intervention group received routine treatment of constipation in addition to probiotics. Patients were examined 2 and 4 weeks after the intervention. Initial assessment included the frequency of bowel movements per week, stool consistency, number of fecal incontinence per week, and abdominal pain and painful defecation. The secondary assessment consisted of successful treatment, and side effects such as diarrhea and vomiting.

Findings: The results showed no statistically significant difference between the two groups before and 2 and 4 weeks after the intervention in terms of the frequency of painful and difficult defecation in ($P > 0.05$). Nevertheless, there was a statistically significant difference between the two groups in terms of abdominal pain in 2 and 4 weeks after the intervention ($P < 0.05$).

Conclusion: The results show that probiotics have no side effects; thus, their addition to standard therapy can be useful in children with functional constipation.

Keywords: Functional constipation, Probiotics, Children

Citation: Abediny M, Ataiee P, Afkhamzadeh A, Seifmanesh M, Sedaghat B. **The Effect of Probiotics on the Treatment of Functional Constipation in Children of 4–12 Years of Age.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2448-54

1- Assistant Professor, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of Community Medicine, School of Medicine AND Gastroenterology and Liver Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
3- Resident, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
Corresponding Author: Banafsheh Sedaghat, Email: bani.2010@yahoo.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷

بروز مقایسه‌ای پروتئین مهار کننده‌ی تومور Breast Cancer1 (BRCA1) در نمونه‌های سرطانی و سالم کولورکتال

دکتر مهدی نیکبخت دستجردی[۱]، وحید کاشانیان[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژن‌های مهار کننده‌ی تومور متفاوتی در سرطان کولورکتال نقش دارند که از این بین، نقش ژن مهار کننده‌ی تومور Breast cancer1 (BRCA1) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عملکرد بیولوژیکال BRCA1 در سرطان شناخته شده است و اهمیت پروگنوستیک آن درسرطان کولورکتال تصدیق شده است؛ به طوری که کاهش بیان این پروتئین درسرطان، نشانگر پیش‌آگهی ضعیف برای بیماران می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی بیان پروتئین BRCA1 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در مقایسه با بافت طبیعی مجاور تومور به روش ایمونوهیستوشیمی انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ۵۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال و ۵۰ نمونه‌ی بافت سالم مجاور تومور جمع‌آوری شد. بیان پروتئین BRCA1 با روش ایمونوهیستوشیمی بر روی مقاطع پارافینی بررسی گردید.

یافته‌ها: میزان بروز پروتئین BRCA1 در نمونه‌های سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور آن‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (P = ۰/۰۲۶).

نتیجه‌گیری: روتئین BRCA1 می‌تواند به عنوان یک نشانگر بیولوژیک مناسب در تشخیص و به عنوان یک عامل پیش‌آگهی دهنده در سرطان کولورکتال استفاده گردد.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، ایمونوهیستوشیمی، Breast cancer1، ژن مهار کننده‌ی تومور

ارجاع: نیکبخت دستجردی مهدی، کاشانیان وحید. **بروز مقایسه‌ای پروتئین مهار کننده‌ی تومور Breast Cancer1 (BRCA1) در نمونه‌های سرطانی و سالم کولورکتال.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۶۰-۲۴۵۵

مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal cancer) یکی از سرطان‌های خطرناک در انسان و جزء چهار سرطان شایع منجر به مرگ می‌باشد. با وجود پیشرفت‌های حاصل شده در تشخیص و درمان بیماری، بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ اغلب دچار عود موضعی و در مراحل انتهایی بیماری دچار متاستاز به غدد لنفاوی، کبد و ریه می‌شوند که به طور چشم‌گیری میزان بقای ۵ ساله‌ی بیماران را کاهش می‌دهد. با توجه به اهمیت موضوع، انجام تحقیقات بیشتر جهت بررسی مکانیسم و پیشرفت سرطان روده‌ی بزرگ و همچنین، پیداکردن نشانگرهای زیستی بالقوه، جهت تشخیص سریع‌تر و بررسی مناسب پیش‌آگهی سرطان کولورکتال ضروری می‌باشد (۴-۱).

در سال ۱۹۹۰، ژن Breast cancer1 (BRCA1) به عنوان یک ژن مهار کننده‌ی تومور در ارتباط با سرطان پستان کشف شد. این ژن، بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره‌ی ۱۷ واقع شده است و نوعی فسفوپروتئین هسته‌ای را کد می‌کند که در حفظ ثبات ژنومی، کنترل تکثیر سلولی، ترمیم DNA و القای آپوپتوز نقش دارد. یکی از علل بروز سرطان، عدم بیان ژن مهار کننده‌ی تومور BRCA1 به علت تغییر در وضعیت متیلیشن پروموتر آن می‌باشد. عملکرد بیولوژیکال BRCA1 در سرطان شناخته شده است و اهمیت آن در پیش‌آگهی سرطان کولورکتال تصدیق شده است؛ به طوری که کاهش بیان این پروتئین در سرطان، نشانگر پیش‌آگهی ضعیف برای بیماران می‌باشد (۶-۵).

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهدی نیکبخت دستجردی
Email: nikbakht@med.mui.ac.ir

ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry یا IHC) یک تکنیک آسان، ارزان و در دسترس می‌باشد که به عنوان یک روش معمول برای غربال‌گری در بیماری‌های ژنتیک مانند سندرم لینچ (Lynch syndrome) در سرطان روده‌ی بزرگ و در سال‌های اخیر، سرطان آندومتر استفاده می‌شود (۸-۷). یک مطالعه‌ی بزرگ نشان داد که غربال‌گری با IHC برای جهش‌های ژنتیک پس ازانجام آزمایش‌های تأییدی مانند آنالیز جهش و یا بررسی هایپرمتیلاسیون، مقرون به صرفه‌ترین روش برای ارزیابی و تشخیص بیماران مبتلا به سندرم لینچ است (۹).

با توجه به مطالب ذکرشده در مورد اهمیت این پروتئین و نیز با توجه به این که سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها می‌باشد و تعیین پیش‌آگهی این بیماران اهمیت فراوانی در امر درمان و تعیین مدت بقای آن‌ها دارد، مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی بیان این پروتئین در نمونه‌های سرطانی کولورکتال در مقایسه با بافت طبیعی مجاور تومور به روش ایمونوهیستوشیمی انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه، تعداد ۵۰ نمونه‌ی سرطانی کولورکتال و ۵۰ نمونه‌ی بافت سالم مجاور تومور جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به صورت بلوک پارافینی آماده، از بخش پاتولوژی بیمارستان الزهرای (س) اصفهان تهیه گردیدند. برای این کار، با حفظ اصول اخلاقی و مشخصات بیماران، به بررسی پرونده‌های موجود در آرشیو بیمارستان الزهرای (س) اصفهان پرداخته و پس از یافتن افراد مبتلا، سن و شماره‌ی پاتولوژی آن‌ها نوشته شد. آن گاه، لام‌ها و بلوک‌های آن‌ها از انبار مربوط بازیابی گردید. سپس به کمک پاتولوژیست، لام‌های نمونه‌های سالم از نمونه‌های سرطانی افتراق داده شد و اطلاعات بالینی-آسیب‌شناختی نمونه‌های جمع‌آوری شده یادداشت گردید (جدول ۱).

تهیه‌ی لام ایمونوهیستوشیمی: پس از تأیید تشخیص پاتولوژی نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی H&E (Hematoxylin and eosin)، به ترتیب مراحل زیر جهت تهیه‌ی لام ایمونوهیستوشیمی انجام گرفت:

۱) آماده‌سازی بافت: ابتدا نمونه‌ها با استفاده از مقادیر صعودی اتانول (۷۰، ۹۵ و ۹۹ درصد) آب‌گیری شدند. پس از آن، توسط گزیلن، شفاف‌سازی و در انتها توسط پارافین قالب‌گیری شدند.

۲) برش گیری: در این مرحله، برش‌های بافتی به ضخامت ۵-۴ میکرون تهیه شد.

۳) رنگ‌آمیزی ایمونوهستوشیمی: در این مرحله، نمونه‌ها با غوطه‌ورسازی درگزیلل، پارافین‌زدایی شدند. سپس، با استفاده از مقادیر نزولی اتانول (۹۹، ۹۵ و ۷۰ درصد) آب‌دهی صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد، به منظور توقف فعالیت Endogenous peroxide، برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت پراکسید هیدروژن ۵ درصد انکوبه شدند. پس از آن، برش‌ها در آب جاری شستشو داده شد. در مرحله‌ی بعد، به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در بافر ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم در یک اون میکروویو، بازیابی آنتی‌ژن (Antigen retrieval) انجام گرفت. پس از انجام مراحل ذکر شده، فعالیت Endogenous peroxide با استفاده از سرم نرمال (۱۰ درصد Goat) در Tris-buffered saline (TBS) به مدت ۵ دقیقه متوقف و در مرحله‌ی بعد، سرم اضافی برداشت گردید و آنتی‌بادی اولیه [monoclonal antibody against BRCA1 (ab-1) clone ms110 (mab) from culbiochem(Merk,cat.NO OP92)] با رقت ۱:۲۰۰ به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد اضافه شد.

مراحل بعدی، شامل دو بار شستشو با TBS، هر بار به مدت ۵ دقیقه، انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه [HRP anti-mouse antibody (dako,Copenhagen,benmark)] با رقت ۱:۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه و دو بار شستشو با TBS، هر بار ۵ دقیقه بود. همچنین، واکنش کروموژنیک با استفاده از Diaminobenzidine انجام شد، رنگ‌آمیزی مخالف نیز با Hematoxilin انجام شد. رنگ قهوه‌ای نشان دهنده‌ی بروز پروتئین و رنگ آبی نشان دهنده‌ی عدم بروز پروتئین BRCA1 در سلول‌ها بود. در آخر، نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند. در گروه‌های شاهد منفی، از Phosphate-buffered saline (PBS) به جای آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده شد.

بررسی میکروسکوپیک مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی:

مقاطع نشان‌دار شده با آنتی‌بادی به منظور بررسی میکروسکوپیک با استفاده از میکروسکوپ نوری و به کارگیری نرم‌افزار Motic image plus Advanced 2.0 در ۱۰ محدوده‌ی متفاوت تصویربرداری شدند. پس از آن، جهت بررسی کمی از نمایشگر Liquid-crystal display (LCD) استفاده گردید. در این بررسی، حداقل ۱۰۰ سلول رنگ‌آمیزی شده در هر محدوده از لام و در مجموع، حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش گردید (در هر لام، سلول‌ها در ۱۰ محدوده شمارش شدند). شمارش سلول‌های رنگ‌آمیزی شده بدون اطلاع قبلی از هویت نمونه‌ها، توسط دو نفر انجام گرفت و پس از آن، درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به رنگ قهوه‌ای نسبت به سلول‌هایی که رنگ آبی گرفته بودند، در هر لام مشخص شد و بر این اساس، نمونه‌های سرطانی و سالم به سه گروه تقسیم شدند:

۱) گروه + که درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی (میزان بروز پروتئین) در آن‌ها ۲۵-۵ درصد بود،

۲) گروه ++ که درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی (میزان بروز

پروتئین) در آن‌ها ۷۵-۲۵ درصد بود،

۳) گروه +++ که درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی (میزان بروز پروتئین) در آن‌ها ۱۰۰-۷۵ درصد بود.

پس از این مرحله، تعداد نمونه‌ها در هر یک از سه گروه پیش‌گفته شمارش شد و مطابق جدول ۲ مقدار P بر اساس مقایسه‌ی مجموعه نمونه‌های + و ++ در مقابل نمونه‌های +++ در دو گروه نمونه‌های سرطانی و سالم با استفاده از χ^2 مشخص گردید. از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) جهت واکاوی داده‌ها استفاده گردید. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری تلقی گردید.

یافته‌ها

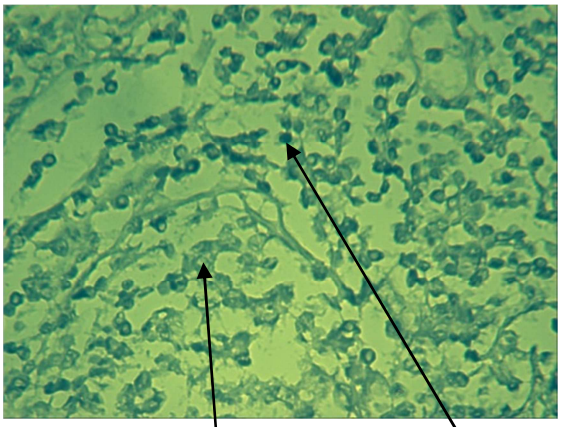
در این مطالعه، تعداد ۵۰ نمونه‌ی سرطان کولورکتال به عنوان گروه مورد و ۵۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه‌های تومور، به عنوان گروه شاهد استفاده گردید. خصوصیات دموگرافیک نمونه‌های سرطانی شامل سن، جنس، محل تومور و نوع تومور در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. مشخصات دموگرافیک ۵۰ نمونه‌ی مبتلا به سرطان آدنوکارسینومای کولورکتال

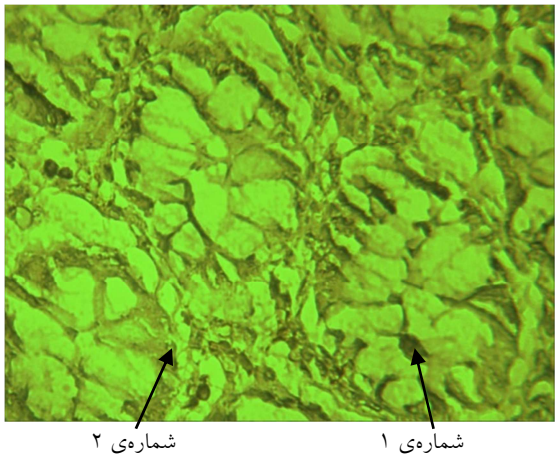
متغیر		تعداد
جنس	مرد	۳۳
	زن	۱۷
سن (سال)	≥ ۶۰	۳۲
	≤ ۵۹	۱۸
نوع تومور	آدنوکارسینومای موسینی	۸
	آدنوکارسینومای غیر موسینی	۴۲
درجه‌ی تومور	G_1	۳۱
	G_2	۱۴
	G_3	۵
محل تومور	کولون	۳۶
	رکتوسیگموئید	۱۴

بعد از مراحل آماده‌سازی بافت و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، تمامی نمونه‌ها مورد تأیید پاتولوژی نیز قرار گرفتند. در شکل ۱، نمونه‌ی بافت سرطانی کولورکتال مشاهده می‌شود که در آن، بخش اعظم سلول‌ها به رنگ آبی می‌باشند. همچنین، در شکل ۲، نمونه‌ی بافت سالم کولورکتال مشاهده می‌شود که در آن بخش اعظم سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای در آمده‌اند.

برای ارزیابی پروتئین BRCA1 پس از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، در ۱۰ محدوده‌ی تصویربرداری در مجموع حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش گردید و درصد سلول‌هایی که رنگ قهوه‌ای گرفته بودند، تعیین شد. همچنین، درصد سلول‌هایی که رنگ قهوه‌ای نداشتند (رنگ آبی)، نیز محاسبه گردید. پس از آن، درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به رنگ قهوه‌ای نسبت به سلول‌هایی که رنگ آبی گرفته بودند، در هر بافت مشخص و بر این اساس، نمونه‌های سرطانی و سالم به سه گروه تقسیم شدند.



شکل ۱. نمونه‌ی بافت سرطانی کولورکتال. سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای یا آبی در آمده‌اند، اما بخش اعظم سلول‌ها به رنگ آبی می‌باشند (۴۰ ×).
فلش شماره‌ی ۱ سلول قهوه‌ای و فلش شماره‌ی ۲ سلول آبی رنگ را نشان می‌دهد.



شکل ۲. نمونه‌ی بافت سالم کولورکتال. بخش اعظم سلول‌ها به رنگ قهوه‌ای در آمده‌اند(۴۰ ×).

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بروز پروتئین BRCA1 در نمونه‌های سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور آن‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P = ۰/۰۲۶$) (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه‌ی بروز پروتئین **BRCA1** در نمونه‌های سرطانی کولورکتال با بافت سالم مجاور (مارژین)

متغیر		گروه: مورد (بافت توموری) تعداد (درصد)	گروه: شاهد (بافت سالم) تعداد (درصد)	مقدار P
نمونه‌ها	+	۱۳ (۲۶)	۸ (۱۶)	*۰/۰۲۶
	++	۲۱ (۴۲)	۱۵ (۳۰)	
	+++	۱۶ (۳۲)	۲۷ (۵۴)	

* مقدار P بر اساس مقایسه‌ی مجموعه‌ی نمونه‌های + و ++ در مقابل نمونه‌های +++ در دو گروه سرطانی و سالم به دست آمده است.

بحث

سرطان کولورکتال، یک بیماری خطرناک، کشنده و در عین حال قابل پیش‌گیری می‌باشد که همواره مورد توجه محققین در مراکز تحقیقاتی سراسر دنیا بوده است. این سرطان، جزء سه سرطان شایع در دنیا می‌باشد (۱۰). ژن‌های مهار کننده‌ی تومور زیادی در سرطان کولورکتال نقش دارند که از این بین، نقش و جایگاه ژن مهار کننده‌ی تومور BRCA1 از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. BRCA1، یک ژن سرکوبگر تومور می‌باشد که فقدان آن، منجر به آسیب‌های زیادی در ژنوم می‌شود. بنا بر این، تغییرات در بیان این ژن موجب آسیب پذیری سلول‌های بدن از جمله سلول‌های قسمت کولورکتال نسبت به انکوژن‌ها می‌گردد (۱۱).

بیان ژن BRCA1 در بعضی از انواع سرطان‌ها نظیر سرطان سینه، تخمدان و همچنین سرطان‌های مربوط به دستگاه گوارش مثل سرطان کولورکتال کاهش می‌یابد. مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که میزان بروز پروتئین BRCA1 در نمونه‌های سرطانی بیماران مبتلا به سرطال کولورکتال نسبت به بافت سالم مجاور آن‌ها به طور معنی‌داری کاهش دارد.

مطالعات متعددی توسط محققین صورت گرفته است که در آن‌ها، کاهش میزان بروز پروتئین BRCA1 در بعضی از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال مشاهده شده است. در مطالعه‌ی Yuanming و همکاران بر روی ۱۲۰ کودک مبتلا به سرطان کولورکتال، نشان داده شد که میزان بیان ژن BRCA1 با متاستازهای سرطان کولورکتال ارتباط معکوس دارد. همچنین، نتایج مطالعه‌ی آنان نشان داد که BRCA1 در این بیماران، می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی برای تشخیص متاستاز به گره‌های لنفاوی عمل نماید. در نهایت، آنان گزارش نمودند که کاهش بیان ژن BRCA1 در بیماران مبتلا به سرطان‌های کولورکتال نشانه‌ی پیش‌آگهی ضعیف می‌باشد (۱۲).

در مطالعه‌ی Grabsch و همکاران، گزارش شد که الگوی بیان ژن BRCA1 پیش‌بینی کننده‌ی میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال می‌باشد. همچنین، گزارش شد که میزان پایین بیان ژن BRCA1 با فقدان بیان ژن‌های MLH1 و MSH2 مرتبط است (۱۳).

Guanghui و همکاران، بیان نمودند که سطح بیان ژن BRCA1 می‌تواند در انتخاب رژیم‌های شیمی‌درمانی و ارزیابی پیش‌آگهی برای بیماران مبتلا به سرطان روده‌ی بزرگ مفید باشد. همچنین، بیان نمودند که سطح بیان ژن BRCA1 در این بیماران پایین‌تر از افراد سالم می‌باشد (۱۴).

Phelan و همکاران، گزارش نمودند که خطر ابتلا به سرطان کولورکتال در زنان زیر سن ۵۰ سال که دارای ژن جهش یافته‌ی BRCA1 هستند، نسبت به افراد فاقد این جهش به طور معنی‌داری بیشتر می‌باشد (۱۵).

با توجه به نتایج ارایه شده در این تحقیق، می‌توان گفت که کاهش بیان ژن BRCA1 و به دنبال آن کاهش بروز پروتئین مربوط، ممکن است نقش مهمی در پیدایش سرطان کولورکتال داشته باشد؛ بنا بر این، از این پروتئین می‌توان به عنوان یک نشانگر تشخیصی در تشخیص سرطان کولورکتال استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای وحید کاشانیان به شماره‌ی ۲۹۲۱۶۲ مصوب شورای طرح‌های تحقیقاتی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله، از کلیه‌ی پرسنل محترم معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی جهت همکاری در اجرای این مطالعه، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Thomas DS, Fourkala EO, Apostolidou S, Gunu R, Ryan A, Jacobs I, et al. Evaluation of serum CEA, CYFRA21-1 and CA125 for the early detection of colorectal cancer using longitudinal preclinical samples. Br J Cancer 2015; 113(2): 268-74.
2. Ling Y, Yang L, Huang H, Hu X, Zhao C, Huang H,

et al. Prognostic significance of statin use in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore) 2015; 94(25): e908.
3. Pickhardt PJ. Colorectal carcinoma: what should the oncologist recommend for screening? Semin Oncol 2015; 42(3): 359-61.
4. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Genomic testing in colorectal cancer: how much is enough? Oncology (Williston Park) 2015; 29(3): 186-8.
5. Tang J, Xi S, Wang G, Wang B, Yan S, Wu Y, et al. Prognostic significance of BRCA1-associated protein 1 in colorectal cancer. Med Oncol 2013; 30(2): 541.
6. Quann K, Jing Y, Rigoutsos I. Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. Front Genet 2015; 6: 242.
7. Kwon JS, Scott JL, Gilks CB, Daniels MS, Sun CC, Lu KH. Testing women with endometrial cancer to detect Lynch syndrome. J Clin Oncol 2011; 29(16): 2247-52.
8. Garg K, Levine DA, Olvera N, Dao F, Bisogna M, Secord AA, et al. BRCA1 immunohistochemistry in a molecularly characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas. Am J Surg Pathol 2013; 37(1): 138-46.
9. Resnick K, Straughn JM, Jr., Backes F, Hampel H, Matthews KS, Cohn DE. Lynch syndrome screening strategies among newly diagnosed endometrial cancer patients. Obstet Gynecol 2009; 114(3): 530-6.
10. Samadaian N, Modaresi MH, Mobasheri M, Ebrahim Zadeh Vesal R, Akrami SM. miRNA-21 expression analysis in 35 colorectal cancer. Tehran Univ Med J 2014; 72(5): 301-6. [In Persian].
11. Davarnia B, Mehdipour P, Arei M, Hosseini-Asl SS. The association between BRCA1 expression and breast cancer tumorogenesis. J Ardabil Univ Med Sci 2012; 12(2): 132-9. [In Persian].
12. Yuanming L, Lineng Z, Baorong S, Junjie P, Sanjun C. BRCA1 and ERCC1 mRNA levels are associated with lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. BMC Cancer 2013; 13: 103.
13. Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, et al. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. Clin Cancer Res 2006; 12(5): 1494-500.
14. Guanghui X, Yu L, Yi L. Relationship between BRCA1 expression and efficacy of platinum-based chemotherapy in colorectal cancer. J Transl Med 2014; 2(1): 240-4.
15. Phelan CM, Iqbal J, Lynch HT, Lubinski J, Gronwald J, Moller P, et al. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. Br J Cancer 2014; 110(2): 530-4.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 19.10.2015
Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016
Accepted: 06.02.2016

Comparative Expression of Breast Cancer 1 Tumor Suppressor Protein in Cancerous and Healthy Colorectal Specimens

Mehdi Nikbakht-Dastjerdi PhD[1], Vahid Kashanian[2]

Original Article

Abstract

Background: Various tumor suppressor genes play a role in colorectal cancer; the role of breast cancer 1 (BRCA1) tumor suppressor gene is of the most importance among them. The biological performance of breast cancer 1 (BRCA1) in cancer has been recognized and its prognostic significance has been verified in colorectal cancer; decrease in the expression of this protein in cancer indicates a poor prognosis for patients. The aim of the current study was to evaluate BRCA1 protein expression in cancerous colorectal specimens compared to healthy tissue surrounding the tumor using immunohistochemistry method.

Methods: A total of 50 cancerous colorectal and 50 healthy specimens were collected. The expression of BRCA1 protein was evaluated upon paraffin sections through immunohistochemistry method.

Findings: The findings of the current study showed that the level of BRCA1 protein expression significantly decreased in cancerous specimens compared to healthy tissue surrounding the tumor (P = 0.026).

Conclusion: The expression of BRCA1 could be used as an appropriate biological marker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer, Immunohistochemistry, Breast cancer 1 (BRCA1), Tumor inhibitor gene

Citation: Nikbakht-Dastjerdi M, Kashanian V. **Comparative Expression of Breast Cancer 1 Tumor Suppressor Protein in Cancerous and Healthy Colorectal Specimens.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2455-60

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mehdi Nikbakht-Dastjerdi PhD, Email: nikbakht@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵

بررسی القای آپوپتوزیس ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه در رده‌ی سلولی ملانوما در مقایسه با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان

نسیم دانا[۱]، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد[۲]، لاله رفیعی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نقص در آپوپتوزیس (Apoptosis) نقش مهمی در تشکیل تومورها بازی می‌کند و به هم خوردن تنظیم آن، باعث مقاومت به درمان می‌شود. تأثیرات انار در مهار آپوپتوزیس و تکثیر سلولی برخی از سرطان‌ها به اثبات رسیده است. در این مطالعه، به بررسی تأثیر عصاره‌ی پوست انار سیاه بر بقای سلولی، مورفولوژی و آپوپتوزیس سلول‌های ملانوما و اندوتلیال پرداخته شد.

روش‌ها: عصاره‌ی هیدروالکلی انار پوست سیاه تهیه شد. آزمون سنجش سمیت MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) با دوزهای (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره و گروه شاهد با دی‌متیل سولفوکساید ۰/۱ درصد، بر روی رده‌های ملانوما و اندوتلیال انجام شد. آپوپتوزیس با استفاده از کیت Annexin-V و دستگاه فلوسیتومتر و مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ بررسی گردید.

یافته‌ها: عصاره‌ی انار در مدت زمان ۴۸ ساعت به طور وابسته به دوز، موجب کاهش معنی‌دار درصد بقای سلول‌های ملانوما شد ($P < ۰/۰۵$)، اما بر سلول‌های اندوتلیال اثر سمی نداشت. تیمار با دوز (۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) IC50 (Half maximal inhibitory concentration) منجر به القای آپوپتوزیس اولیه (۴۳/۰۵ درصد) و ثانویه‌ی (۰/۰۵ درصد) ملانوما گردیدکه نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت ($P < ۰/۰۵$) و ۵۶/۹ درصد سلول‌های زنده سالم بودند. القای آپوپتوزیس در سلول‌های اندوتلیال مشاهده نشد؛ تنها سلول‌های ملانوما پس از تیمار، دچار تغییرات مورفولوژیک از جمله چروکیدگی و گرد شدن غشا شدند.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث القای آپوپتوزیس، مرگ و تغییر مورفولوژی سلول‌های ملانوما می‌شود، اما بر روی سلول‌های اندوتلیال اثر ندارد. به نظر می‌رسد که این عصاره، می‌تواند با آزمایش‌های بیشتر به عنوان گزینه‌ی مناسبی برای القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی ملانوما به عنوان درمان کمکی استفاده شود.

واژگان کلیدی: ملانوما، عصاره‌ی پوست انار سیاه، آپوپتوزیس

ارجاع: دانا نسیم، حق‌جوی جوانمرد شقایق، رفیعی لاله. **بررسی القای آپوپتوزیس ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه در رده‌ی سلولی ملانوما در مقایسه با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۶۸-۲۴۶۱

مقدمه

درمان سرطان با شیمی درمانی و پرتودرمانی، همواره با بروز عوارض جانبی همراه بوده است؛ چرا که در این روش‌های درمانی، علاوه بر سلول‌های سرطانی، سلول‌های طبیعی هم هدف قرار می‌گیرند. در واقع، این روش‌های درمانی، به نسبت غیر انتخابی عمل می‌کنند و برخی از سرطان‌ها به این درمان‌ها مقاوم هستند (۱).

مرگ سلولی، نقشی مهم و اساسی در کنترل فیزیولوژی طبیعی بدن و بسیاری از شرایط پاتولوژیک ایفا می‌کند (۳-۲). اگر چه اغلب برای سهولت، مرگ سلولی را به دو دسته‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) و مرگ تصادفی (نکروز)، تقسیم می‌کنند، اما مطابق یک طبقه‌بندی، حدود ۱۱ نوع مرگ سلولی وجود دارد که برخی ازآن‌ها عبارت از آپوپتوزیس، نکروز، اتوفاژی، انکوزیس پیروپتوزیس و ... می‌باشند(۳).

آپوپتوزیس (Apoptosis) مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوزیس خود، در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های واکنش‌گر نقش دارد (۴). هر گونه اختلال در روند آپوپتوزیس، منجر به بیماری

۱- دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و پژوهشکده‌ی قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد
Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

می شود که می تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشدکه منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌گردد (۵).

نقص در آپوپتوزیس، نقش مهمی در تشکیل تومورها و ایجاد نئوپلازی بازی می کند و به هم خوردن تنظیم آن، باعث مقاومت به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌گردد. این روند، ممکن است باعث افزایش متاستاز نیز بشود (۶). به طور کلی، تدابیر آپوپتوتیک برای کشتن سلول‌های توموری، شامل القای مستقیم مولکول‌های پروآپوتوتیک و تعدیل پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک یا بازسازی عملکرد ژن‌های مهار کننده‌ی رشد تومورها است (۷).

ملانومای بدخیم، یک سرطان پوست به شدت قابل گسترش به سایر اندام‌ها (Metastatic) است که به صورتی قابل توجه به درمان‌های متداول با Dacarbazine یا تموزولامایید و هچنین، پرتودرمانی مقاوم است. در واقع، در بهترین شرایط تنها ۳۰-۱۵ درصد پاسخ به درمان مشاهده می‌شود (۸). مسیرهای انتقال پیام مختلفی شناسایی شده‌اند که یا به طور ذاتی و یا تحت تأثیر جهش در تومورهای ملانوما فعال می‌شوند و تومورهای ملانوما، با استفاده از آن‌ها به بقا، تکثیر و مقاومت به آپوپتوزیس و در نهایت متاستاز دست می‌یابند (۱۰-۹).

خواص متنوع بیولوژیک گیاهان دارویی، سال ها توسط محققان مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله این که به تازگی، مطالعات بسیاری بر روی خاصیت ضد سرطانی بخش‌های مختلف گیاهان انجام شده است. از جمله گیاهان مؤثر بر روند آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی، می‌توان به گیاه انار اشاره کرد.

در مطالعات متعددی مشخص شده است که انار، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد التهابی است (۱۱). درخت انار، درخت کوچکی از خانواده‌ی Punicaceae است (۱۲). پوست انار محتوی مواد پلی‌فنول مانند الاجیک اسید، الاجی تانن‌ها و گالیک اسید و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. مطالعات انجام شده، نشان داده است که بسیاری از ترکیبات تشکیل دهنده‌ی پوست انار مانند کوئرسیتین، لوتئولین و کامپفرول در برابر دامنه ی وسیعی از پرواکسیدان‌ها در سیستم‌های لیپیدی، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند (۱۵-۱۳).

انار پوست سیاه، یکی از انواع انار است که در ایران پرورش داده می‌شود، اما نسبت به سایر گونه‌ها کمیاب است (۱۶). این گونه از انار، به ویژه پوست آن در طب سنتی در درمان چندین بیماری کاربرد دارد. مطالعات نشان می‌دهند که پوست این نوع انار، فلاونوئیدهای بیشتری نسبت به سایر انواع انار دارد (۱۷). مطالعات قبل، نشان می‌دهد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، دارای خواص ضد آنژیوژنز و ضد سرطانی است (۱۹-۱۸). در چندین مطالعه، خواص ضد سرطانی ترکیبات مختلف انار همچون روغن هسته و آب میوه‌ی آن، بر سرطان‌هایی نظیر پروستات، پستان، کولون و ریه، از طریق القای آپوپتوزیس نشان داده شده است (۲۲-۲۰).

با توجه به نتایج مطالعات قبلی و اثرات بخش‌های مختلف انار بر روی رده‌های سلولی سرطانی، در صورتی که بتوان راه‌کاری یافت تا با مداخله در آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی، مرگ آن‌ها را دستکاری نمود، شاید مسیر جدیدی در درمان سرطان فراهم آید. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر عصاره‌ی پوست انار سیاه بر میزان بقا و آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی ملانوما و مقایسه‌ی آن با سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان بود.

روش‌ها

تهیه‌ی عصاره: انار شیرین پوست سیاه ساوه از کلکسیون باغ انار مرکز تحقیقات کشاورزی منطقه ی دستگرد اصفهان تهیه و نام علمی آن توسط همین مؤسسه تأیید شد. پودر پوست خشک انار با حلال اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد اسید استیک، مخلوط و عصاره‌گیری انجام شد (۲۳).

در ادامه، عصاره به طور جداگانه درون ویال های متعدد ریخته شد و این ویال‌ها جهت تبخیر اتانول استفاده شده در فرایند عصاره‌گیری، به دستگاه Ependorf concentrator تحت خلأ و دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. پودر حاصل تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت سلول: رده‌ی سلولی سرطانی ملانومای پوستی B16F10 و سلول‌های اندوتلیال وریدی بند ناف انسان (HUVECs یا Human umbilical vein endothelial cells) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها، در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد Carbon dioxide (CO_2) انکوبه شدند. شمارش سلولی با هموسایتومتر انجام شد. در تمامی آزمون‌ها، ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان‌بلو تعیین گردید که همواره بیش از ۹۵ درصد بود.

بررسی سمیت سلولی: به منظور سنجش اثر سمیت سلولی از آزمون MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد.

معرف MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، جذب میتوکندری سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیک می‌شود و بلور فورمازان بنفش رنگ تولید

می‌کند که در حلال مناسب (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) حل می‌گردد و میزان رنگ تولید شده، با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود (۲۴).

برای انجام این آزمون، ابتدا سلول‌های ملانوما و اندوتلیال هر کدام به صورت جداگانه به تعداد $10^4 \times 1$ در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه در محیط کشت کامل کشت و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها برای مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های متفاوت از عصاره‌ی پوست انار (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در محیط کشت سلولی تیمارشدند. سلول‌های تیمار شده با محیط کشت حاوی ۰/۱ درصد DMSO نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.

برای ارزیابی میزان سمیت، ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT طبق شیوه‌نامه (شرکت ایده زیست ایران) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه پیدا کرد. سپس، مایع رویی حذف و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیپتاژ، جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از ELISA reader (Enzyme-linked immunosorbent assay reader) (Elisa reader Biotek elx800) خوانده شد.

سنجش آپوپتوزیس: یکی از روش‌های موجود برای بررسی آپوپتوزیس، آنالیز و مطالعه‌ی مولکول‌های فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی غشا به هنگام فرایند آپوپتوزیس است. مولکول Annexin V یک پروتئین متصل شونده به فسفولیپیدها در حضور یون کلسیم می‌باشد. این ماده، دارای تمایل بالایی برای مولکول فسفاتیدیل سرین است. بنا بر این، برای تشخیص سلول‌های در حال آپوپتوزیس در یک جمعیت سلولی بسیار مناسب است.

در این مطالعه، میزان آپوپتوزیس سلول‌های B16F10 و HUVEC با رنگ‌آمیزی با استفاده از کیت Annexin V-FITC (Ebioscience) و دستگاه فلوسایتومتر اندازه‌گیری شد. به این صورت که سلول‌ها به تعداد $10^5 \times 1$ در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه در محیط کشت کامل به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس، به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار با دوز کشنده‌ی ۵۰ درصد سلول‌ها (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) که در مرحله‌ی قبل محاسبه شده بود، قرار گرفتند.

در مرحله‌ی بعد، سلول‌ها با استفاده از بافر نمکی فسفات سرد بر روی یخ از پلیت، جدا و سانتریفوژ شدند. سپس، سلول‌ها با بافر رنگ‌آمیزی شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد، با ۵ میکرولیتر Annexin v-fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC) و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Propidium iodide در ۱۰۰ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه گردیدند. آن گاه، سلول‌ها دوباره شستشو و وارد ۲۵۰ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی شدند. در پایان، سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتر (BD FACS Calibur -e97600295) مورد آنالیز قرار گرفتند.

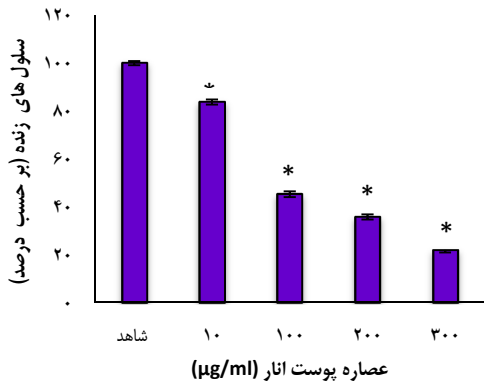
بررسی مورفولوژی: بعد از تیمار سلول‌های سرطانی B16F10 و سلول‌های HUVEC با عصاره‌ی پوست انار سیاه با غلظت ۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت، تغییرات مورفولوژیکی با میکروسکوپ اینورت (Leica) با بزرگ‌نمایی ۱۰ × بررسی و عکس‌برداری انجام شد.

برای بررسی نتایج به دست آمده، از آزمون‌های ANOVA و t استفاده و $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی سمیت سلولی

جهت بررسی تأثیر سمیت عصاره‌ی انار پوست سیاه بر سلول‌های B16F10 و HUVEC، از آزمون MTT استفاده شد. نتایج سنجش سمیت نشان داد که عصاره‌ی پوست انار به صورت وابسته به دوزی دارای اثرات کشندگی بر رده‌ی سلولی ملانوما است؛ به طوری که اثرات کشندگی کلیه‌ی دوزهای تهیه شده از عصاره (۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P < ۰/۰۵$)؛ به این صورت که در پایین‌ترین دوز موجب از بین رفتن ۱۶/۳۵ درصد سلول‌ها و در بالاترین دوز، باعث کشته شدن ۷۶/۷۴ درصد سلول‌ها شد (شکل ۱).



شکل ۱. درصد بقای سلول‌های B16F10 تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار سیاه با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد (تیمار شده با محیط کشت حاوی ۰/۱ درصد دی‌متیل سولفوکساید) به مدت ۴۸ ساعت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

*: معنی‌دار بودن ارقام از لحاظ آماری نسبت به گروه شاهد ($P < ۰/۰۵$)

غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد سلول‌ها یا IC50 عصاره

(۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به دست آمد. از غلظت IC50 محاسبه شده برای سایر مراحل استفاده شد. از سوی دیگر، عصاره‌ی تهیه شده، هیچ گونه اثر سمیت معنی‌داری بر روی سلول‌های اندوتلیال ندارد؛ به طوری که ۴ درصد مرگ در پایین‌ترین دوز و ۹ درصد مرگ در بالاترین دوز نسبت به گروه شاهد وجود داشت و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).

سنجش آپوپتوزیس

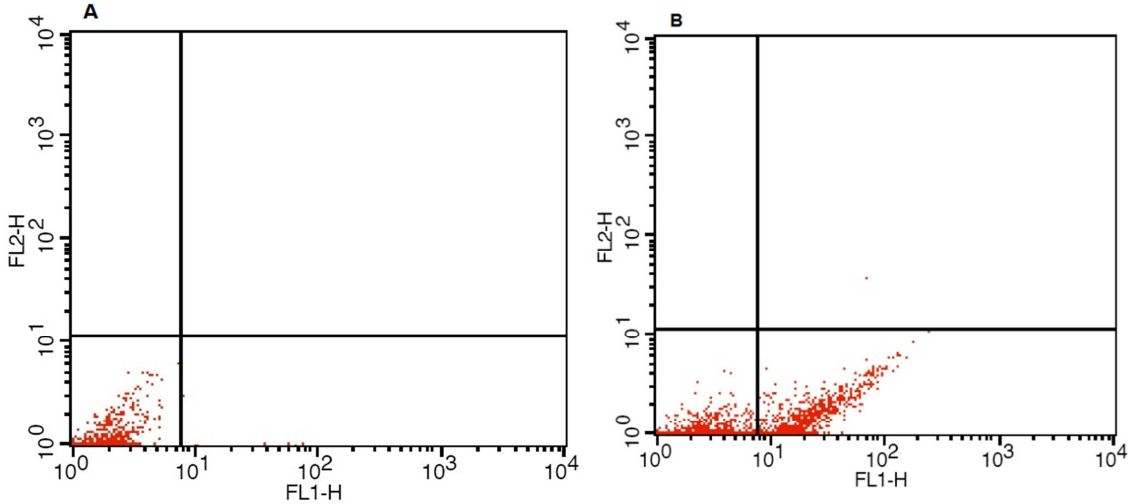
آپوپتوزیس، با رنگ‌آمیزی سلول‌ها و استفاده از کیت Annexin V-FlTC و دستگاه فلوسایتومتر تعیین شد. آپوپتوزیس اولیه با رنگ گرفتن سلول‌ها با Annexin V-FITC و رنگ گرفتن سلول‌ها با هر دو رنگ Annexin و Propidium iodide به منزله‌ی آپوپتوزیس ثانویه‌ی مثبت در نظر گرفته شد. سلول‌های فاقد تیمار (گروه شاهد)، ۹۹/۹ درصد سلول زنده‌ی سالم داشتند و تنها ۰/۱ درصد آپوپتوزیس اولیه نشان دادند (شکل ۲-A)، اما سلول‌های B16F10 تیمار شده با عصاره (۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۴۸ ساعت، ۵۶/۹ درصد سلول زنده‌ی سالم، ۴۳/۰۵ درصد آپوپتوزیس اولیه و ۰/۰۱ درصد آپوپتوزیس ثانویه داشتند (شکل ۲-B). این امر نشان می‌دهد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث القای آپوپتوزیس شده است و بیشترین میزان آپوپتوزیس، آپوپتوزیس اولیه بوده است. تیمار سلول‌های اندوتلیال با دوز IC50، هیچ گونه تأثیری در القای آپوپتوزیس این سلول‌ها نداشت و در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

تغییرات مورفولوژیکی

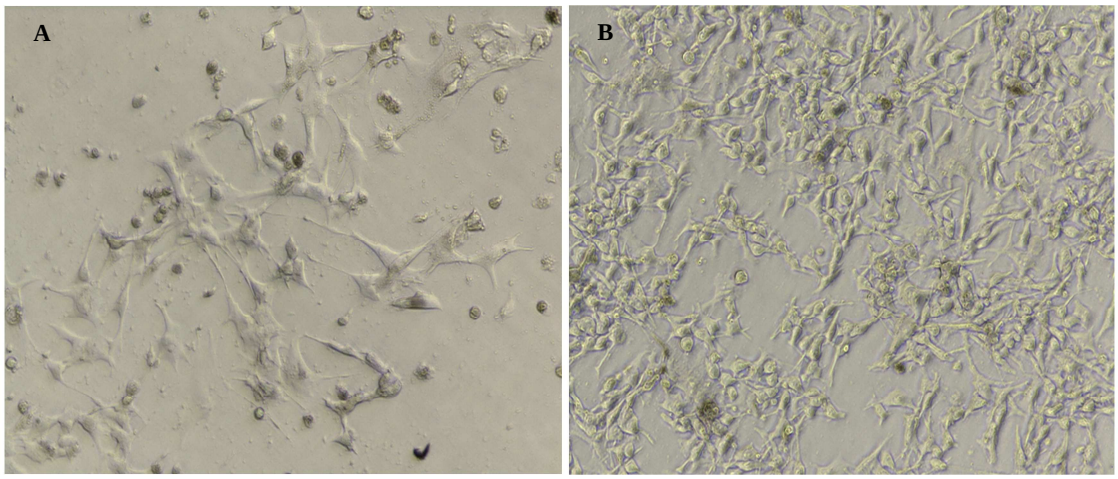
تغییرات مورفولوژی سلول‌های HUVEC و B16F10 با استفاده از میکروسکوپ اینورت بررسی شد. تیمار سلول‌های HUVEC با عصاره، هیچ گونه تأثیری بر مورفولوژی این سلول‌ها نداشت، اما سلول‌های B16F10 پس از تیمار با عصاره با دوز ۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دچار تغییراتی از جمله چروکیدگی و گرد شدن شدند (شکل ۳). آن دست از سلول‌های ملانوما که هنوز دچار آپوپتوزیس نشده‌اند، به دلیل از بین رفتن سایر سلول‌های اطرافشان شروع به کشیده شدن می‌کنند تا دوباره بتوانند اتصالات خود را با سایر سلول‌هایی که هنوز زنده‌اند، ارتباط برقرار کنند. این مشاهدات، نشان می‌دهد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث تغییرات مورفولوژی در سلول‌های ملانوما می‌شود و آثار القای آپوپتوزیس در آن‌ها دیده می‌شود.

بحث

رشد تومورهای سرطانی به دو عامل اصلی تقسیمات سلولی و مرگ سلول‌ها از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده بستگی دارد (۲۶-۲۵). مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول را می‌توان یکی از مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر سرطان دانست. بیان تنظیم نشده‌ی پروتئین‌های مهار کننده‌ی این مسیر مرگ سلولی، می تواند منجر به افزایش طول عمر سلول و در نتیجه، تجمع جهش های تغییر شکل دهنده و در نهایت، شروع و پیشرفت سرطان شود (۵). همچنین، افزایش بیان پروتئین‌های ضد مرگ برنامه ریزی شده ی سلولی، منجر به رفتار تهاجمی تومور و مقاومت به درمان می‌شود (۶). در تحقیقات متعدد، رابطه‌ی معنی‌داری بین مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول و پیش‌آگهی سرطان‌هایی همچون ریه، پستان و مری نشان داده شده است (۲۷).



شکل ۲. آنالیز فلوسایتومتری آپوپتوزیس سلول‌های B16F10 با استفاده از کیت Annexin V. A- سلول‌های B16F10 بدون تیمار (گروه شاهد). B- آپوپتوزیس القا شده به سلول‌های B16F10 ناشی از تیمار با عصاره‌ی پوست انار سیاه به میزان ۷۷/۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر. میزان سلول زنده‌ی سالم ۵۶/۹ درصد، میزان آپوپتوزیس اولیه ۴۳/۰۵ درصد و میزان آپوپتوزیس ثانویه ۰/۰۵ درصد بوده است.



شکل ۳. مورفولوژی سلول‌های B16F10 با استفاده از میکروسکوپ اینورت Leica با بزرگ‌نمایی ۱۰ ×. A- سلول‌های تیمار نشده. B- سلول‌های تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار سیاه به میزان ۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر

در این مطالعه، به بررسی اثر تیمار سلول‌های ملانوما (B16F10) با عصاره‌ی پوست انار سیاه بر میزان آپوپتوزیس و بقای این سلول‌ها پرداخته شد و نتایج آن با سلول‌های اندوتلیال مقایسه گردید. آنالیز بقای سلولی نشان داد که عصاره‌ی پوست انار سیاه، باعث کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های B16F10 می‌شود. همچنین، مطالعه‌ی آنالیز آپوپتوزیس با استفاده از فلوسایتومتری نشان داد که این عصاره، به صورت معنی‌داری باعث القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی ملانوما می‌گردد. نکته‌ی جالب در نتایج این تحقیق، نداشتن اثر سمیت عصاره بر سلول‌های اندوتلیال به عنوان سلول طبیعی می‌باشد.

محققین در مطالعات *In vitro* که بر روی رده‌های سلولی سرطان پروستات انجام گرفته است، نشان داده‌اند که قسمت‌های مختلف گیاه انار (آب، روغن هسته و پوست)، اثرات مهاری بر تهاجم و تکثیر سلول‌ها دارند و موجب القای آپوپتوزیس در آن‌ها می‌شوند (۲۹-۲۸). در دو مطالعه‌ی حیوانی نیز مشاهده شده است که انار، موجب مهار رشد و القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود (۳۰، ۲۲).

نتایج یک مطالعه‌ی کارآزمایی بالینی بر روی ۴۶ مرد دریافت کننده‌ی آب انار، کاهش معنی‌داری را در سطح سرم آنتی‌ژن اختصاصی پروستات این افراد نشان داد. همچنین، نتایج این مطالعه، گویای این است که تیمار رده‌های سلولی سرطان پروستات با سرم یا پلاسمای این بیماران، موجب افزایش آپوپتوزیس و کاهش تکثیر آن‌ها می‌شود (۳۱).

از سوی دیگر، بررسی اثر ترکیبات انار بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه، نشان می‌دهد که این ترکیبات، موجب مهار آنژیوژنز، تکثیر و تهاجم این سلول‌ها می‌شود و از همه مهم‌تر، موجب القای آپوپتوزیس در آن‌ها می‌گردد (۳۴-۳۲). در مطالعات دیگری مشخص شده است که عصاره‌های مختلف انار، میزان تکثیر و آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی اپیدرم حنجره (Human epithelial type 2 یا Hep2)، رده‌ی سرطانی دهانه‌ی رحم انسان HeLa ، سلول‌های A549 (سرطان ریه) و رده‌ی سلولی فیبروکارسینوما (WEHI-164) را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۳۷-۳۵).

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، در طی ۴۸ ساعت، از بین رفتن سلول‌های ملانوما، تغییرات مورفولوژیک و القای آپوپتوزیس در آن‌ها، می‌تواند نشان دهنده‌ی تأثیر عصاره بر غشای پلاسمایی این سلول‌های سرطانی و مختل شدن روند حیات آن‌ها باشد. به نظر می‌رسد که این عصاره، دارای توانایی مناسبی برای استفاده بر ضد سلول‌های سرطانی است و این در حالی است که بر روی سلول‌های طبیعی اثر نمی‌گذارد. از این رو، مطالعات بیشتری نیاز است تا شاید بتوان از این عصاره به عنوان درمان کمکی همراه با درمان‌های رایج سرطان ملانوما استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۲۹۱۱۰۱ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین بودجه و امکانات لازم برای انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Klein S, Levitzki A. Signal transduction therapy for cancer - Whither now? Curr Signal Transduct Ther 2006; 1(1): 1-12.
2. Han SI, Kim YS, Kim TH. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. BMB Rep 2008; 41(1): 1-10.
3. Tait JF. Imaging of apoptosis. J Nucl Med 2008; 49(10): 1573-6.
4. Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. Sci Signal 2010; 3(145): re8.
5. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res 2011; 30: 87.
6. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis 2000; 21(3): 485-95.
7. Adachi S, Leoni LM, Carson DA, Nakahata T. Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. Acta Haematol 2004; 111(1-2): 107-23.
8. Collins I, Workman P. Design and development of signal transduction inhibitors for cancer treatment: Experience and challenges with kinase targets. Curr Signal Transduct Ther 2006; 1(1): 13-23.
9. Kashani-Sabet M, Shaikh L, Miller III JR, Nosrati M, Ferreira CMM, Debs RJ, et al. NF-kB in the Vascular Progression of Melanoma. J Clin Oncol 2004; 22(4): 617-23.
10. Kashani-Sabet M, Liu Y, Fong S, Desprez PY, Liu S, Tu G, et al. Identification of gene function and functional pathways by systemic plasmid-based ribozyme targeting in adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(6): 3878-83.
11. Yoshimura M, Watanabe Y, Kasai K, Yamakoshi J, Koga T. Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. Biosci Biotechnol Biochem 2005; 69(12): 2368-73.
12. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2003; 11(11): 821-30.
13. Gu L, Weng X. Antioxidant activity and components of Salvia plebeia R.Br._ب_G_¤ a Chinese herb. Food Chemistry 2001; 73(3): 299-305.
14. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. Punica granatum L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. J Nutr 2005; 135(9): 2096-102.
15. Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, Yoshimura H. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. J Ethnopharmacol 2004; 92(1): 93-101.
16. Moghaddam Gh, Sharifzadeh M, Hassanzadeh Gh, Khanavi M, Hajimahmoodi M. Anti-ulcerogenic activity of the pomegranate peel (Punica granatum) methanol extract. Food Nutr Sci 2012; 4(10A): 43-8.
17. Shams Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Ranjbar AM, et al. Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. Iran J Pharm Res 2011; 10(3): 519-24.
18. Dana N, Haghjooy Javanmard Sh, Fazilati M, Pilehvarian AA. Anti-angiogenic effects of pomegranate peel extract (Punica Granatum L.) on human umbilical vein endothelial cells. J Isfahan Med Sch 2012; 30(195): 913-21. [In Persian].
19. Dana N, Javanmard S, Rafiee L. Antiangiogenic and antiproliferative effects of black pomegranate peel extract on melanoma cell line. Res Pharm Sci 2015; 10(2): 117-24.
20. Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. Adv Biomed Res 2014; 3: 100.
21. Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. Oxid Med Cell Longev 2015; 2015: 938475.
22. Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. Cell Cycle 2006; 5(4): 371-3.
23. Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K, Reiss K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. Clin Cancer Res 2006; 12(10): 3028-36.
24. Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, Ware CF, Godzik A, Reed JC. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. J Biol Chem 2001; 276(26): 24242-52.
25. Vaish M, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: a clinical significance. BMC Urology 2005; 5(2).
26. Guo M, Hay BA. Cell proliferation and apoptosis. Curr Opin Cell Biol 1999; 11(6): 745-52.
27. Tao KY, Li XX, Xu WZ, Wang Y, Zhu SM, Xie HX, et al. Prognostic role of apoptosis-related gene functional variants in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. Onco Targets Ther 2015; 8: 147-55.
28. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, et al. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. Invest New Drugs 2005; 23(1): 11-20.
29. Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. J Med Food 2004; 7(3): 274-83.
30. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(41): 14813-8.
31. Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, et al. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. Clin

Cancer Res 2006; 12(13): 4018-26.
32. Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (Punica granatum) for human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2002; 71(3): 203-17.
33. Jeune MA, Kumi-Diaka J, Brown J. Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells. J Med Food 2005; 8(4): 469-75.
34. Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y. The antioxidant potency of Punica granatum L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. J Med Food 2011; 14(12): 1638-46.
35. Sangeetha J, Vijayalakshmi K. Apoptosis induction of Punica granatum extract on human lung cancer cells. Am J PharmTech Res 2015; 5(1): 479–85.
36. Mohammed M, Saad Z. Low concentrations of pomegranate rind extract influence: proliferation, cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines. Iraqi J Comm Med 2011; 1: 1-5.
37. Sineh SK, Baradaran B, Mazandarani M, Yousefi B, Abdollahpour AM, Khori V. Growth-Inhibitory and Apoptosis-Inducing Effects of Punica granatum L. var. spinosa (Apple Punice) on Fibrosarcoma Cell Lines. Adv Pharm Bull 2014; 4(Suppl 2): 583-90.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 22.10.2015
Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016
Accepted: 14.02.2016

Comparison of the Apoptosis Induction Effect of Pomegranate Peel Extract on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Melanoma

Nasim Dana MSc[1], Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD[2], Laleh Rafiee MSc[1]

Original Article

Abstract

Background: Apoptosis defect plays an important role in the formation of tumors and its disruption causes resistance to treatment. The effects of pomegranate on the inhibition of apoptosis and cell proliferation of some cancer types have been demonstrated. The aim of this study was to investigate the effect of black pomegranate peel extract on cell survival, morphology, and apoptosis of melanoma cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Methods: The hydroalcoholic extract of black pomegranate pericarp was prepared. Toxicity of melanoma and HUVEC was evaluated through MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in the experimental group at different concentrations of the extract (10, 100, 200, 300 µg/ml) and dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.1% in the control group. In addition, apoptosis was studied using Annexin-V test and flow cytometry. The morphology of the cells was examined under a microscope.

Findings: After 48 hours, melanoma cell survival significantly decreased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$), but it had no effect on HUVEC proliferation. Exposure of cells to half maximal inhibitory concentration (IC50) at a dose of 77.5 µg/ml led to the induction of early apoptosis (43.05%) and late apoptosis (0.05%) in melanoma cells that was significantly increased compared to the control group ($P < 0.05$). In addition, 56.9% of cells were healthy. Apoptosis induction was not observed in HUVECs. Pomegranate peel extract only induced morphological changes such as cell shrinkage and rounding of cell membrane in melanoma cells.

Conclusion: Pomegranate peel extract induces apoptosis, death, and morphological changes in melanoma cells. However, it has no effect on HUVECs. It seems that this extract can be a good candidate for apoptosis induction in melanoma cells as complementary therapy.

Keywords: Melanoma, Pomegranate peel extract, Apoptosis

Citation: Dana N, Haghjooy-Javanmard Sh, Rafiee L. **Comparison of the Apoptosis Induction Effect of Pomegranate Peel Extract on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Melanoma**. J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2461-8

1- PhD Student, Applied Physiology Research Center AND Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine AND Applied Physiology Research Center AND Cardiovascular Research Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shaghayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD, Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۸/هفته چهارم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۱

نسل جدید روش‌های توالی‌یابی و کاربردهای آن

میثم مصلایی[۱]، حامد میرزایی[۲]، میگانوش سیمونیان[۱]، دکتر مجید خیرالهی[۳]

مقاله مروری

چکیده

توالی‌یابی DNA یک روش آزمایشگاهی است که برای تعیین توالی یک مولکول DNA استفاده می‌شود و خود شامل هر روش یا تکنولوژی می‌باشد که برای تعیین ترتیب چهار باز آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین در یک رشته‌ی DNA به کار برده می‌شود. توالی‌یابی DNA، ممکن است برای تعیین توالی ژن‌های ویژه، مناطق بزرگ ژنومی، کل کروموزوم و کل ژنوم به کار برده شود. امروزه، با پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای که در بیولوژی مولکولی به وجود آمده است، روش‌های سنتی توالی‌یابی (به طور عمده تکنیک Sanger) که زمان‌بر و گران می‌باشند، دیگر پاسخگوی نیاز محققان نیستند. در نتیجه، افزایش تقاضا برای کاهش هزینه‌ی توالی‌یابی، به توسعه‌ی تکنولوژی‌های توالی‌یابی با توان عملکردی بالا (نسل جدید توالی‌یابی) منجر شد که قادر به توالی‌یابی هزاران و یا میلیون‌ها توالی به صورت هم‌زمان می‌باشد. نسل جدید توالی‌یابی، قادر به توالی‌یابی سریع قطعات بزرگ DNA در طول ژنوم است و با حداقل ابزارها، قادر به تولید گیگا باز داده در هر مرحله‌ی توالی‌یابی می‌باشد. روش‌های نسل جدید توالی‌یابی، طیف وسیعی از کاربردها نظیر توالی‌یابی کل ژنوم، توالی‌یابی از نو، توالی‌یابی RNA برای کاربردهایی مثل بررسی ترانسکریپتوم و RNAهای کوچک، بررسی متیلاسیون و بررسی برهم‌کنش نوکلئیک اسید و پروتئین را شامل می‌شوند.

واژگان کلیدی: توالی‌یابی، نسل جدید توالی‌یابی، تکنولوژی ۴۵۴، تکنولوژی Solex، Sequencing by oligonucleotide ligation and detection

ارجاع: مصلایی میثم، میرزایی حامد، سیمونیان میگانوش، خیرالهی مجید. **نسل جدید روش‌های توالی‌یابی و کاربردهای آن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۸): ۲۴۸۰-۲۴۶۹

مقدمه

Avery و همکاران در سال ۱۹۴۴ نشان دادند که دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA یا Deoxyribonucleic acid) را به عنوان ماده‌ی وراثتی مطرح نمود (۱). ساختار هلیکس دو رشته‌ای DNA که ترکیبی از چهار نوکلئوتید می‌باشد، در سال ۱۹۵۳ توسط Watson و Crick مشخص شد، که خود منجر به ارایه‌ی نظریه‌ی سنترال دوگما (Central dogma) در زیست‌شناسی مولکولی شد (۲). در اغلب موارد، DNA ژنومی به صورت گونه‌ای و فردی تعریف می‌شود و از توالی‌های آن برای بررسی عملکرد سلول و رمزگشایی راز و رمز موجود زنده استفاده می‌گردد. تکنیک‌های توالی‌یابی قادر هستند به زیست‌شناسان در طیف وسیعی از کاربردها مانند کلونینگ، پیدا کردن ژن‌های پاتوژن و مطالعات مقایسه‌ای کمک کنند. تکنیک‌های توالی‌یابی نسل جدید با توان عملیاتی بالا، یک دریچه‌ی جدید در تحقیقات زیست‌پزشکی باز نمودند. همچنین، وجود نسل جدید دستگاه‌های توالی‌یابی، انقلاب عظیمی در ژنتیک ایجاد نموده‌اند و قادر به توالی‌یابی ژنوم انسان به قیمت ۱۰۰۰ دلار و حتی کمتر در طی چند روز با کیفیت بالا می‌باشند (۳).

تا چند سال پیش، برای توالی‌یابی از روش Sanger (روش دی‌دئوکسی) استفاده می‌شد. این روش، برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ ارایه گردید. در همان سال، Maxam و Gilbert روش توالی‌یابی با تجزیه‌ی شیمیایی را مطرح نمودند (۴). روش Sanger، مجموعه‌ای از قطعات DNA را تولید می‌کند که اندازه‌ی آن‌ها تنها در یک نوکلئوتید با یکدیگر تفاوت دارد (۵). در ابتدا، از ژل پلی‌اکریل آمید برای جداسازی این قطعات DNA استفاده می‌شد، اما به مرور زمان، ستون‌های کوچک جایگزین ژل‌های بزرگ شد. به کمک این ستون‌ها، می‌توان قطعات DNA را در ۳-۲ ساعت از یکدیگر جدا نمود. این

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیر واگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان، پژوهشکده‌ی پیش‌گیری اولیه از بیماری‌های غیر واگیر و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیرالهی
Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

ستون ها، قابلیت استفاده‌ی مجدد را دارند و جدا کردن قطعات بین ۸۰۰-۷۰۰ جفت باز را امکان پذیر می‌سازند؛ یعنی ظرفیتی مشابه با ژل پلی‌اکریل آمید دارند، اما کار با آن‌ها به مراتب ساده‌تر می‌باشد (۶).

با استفاده از نوکلئوتیدهای فلورسنت خاتمه دهنده‌ی زنجیره، پیشرفت مهم دیگری در توالی‌یابی DNA حاصل شد. به طور کلی، در این روش آخرین نوکلئوتید هر یک از قطعات DNA با یک رنگ فلورسنت نشانه‌گذاری می‌شود. بنا بر این، هر قطعه‌ی DNA، دارای اندازه و رنگ منحصر به فردی خواهد بود (۷). همزمان با جدا شدن این قطعات بر روی ستون که بر اساس اندازه‌ی آن‌ها انجام می‌شود، حس‌گرهای فلورسنت، رنگ هر قطعه‌ی DNA را شناسایی می‌کنند. به این ترتیب، یک ستون، یک توالی ۸۰۰-۶۰۰ جفت بازی را در کمتر از ۳ ساعت بر اساس اندازه جداسازی و رمزگشایی می‌کند. دستگاه‌های توالی‌یابی خودکار که از نوکلئوتیدهای فلورسنت استفاده می‌کنند، به گونه‌ای توسعه یافته‌اند که دارای ۳۸۴ ستون مجزا کننده هستند و قادرند در یک اجرای سه ساعته، ۲۰۰ کیلو جفت باز DNA را توالی‌یابی کنند (۸). مجموعه‌ای از صد دستگاه می‌توانند اطلاعاتی معادل توالی ژنوم انسان را تنها در دو ماه ایجاد نمایند. توالی‌های تولید شده توسط نسل جدید دستگاه‌های تعیین توالی، در اصطلاح Read (خوانش) نامیده می‌شوند.

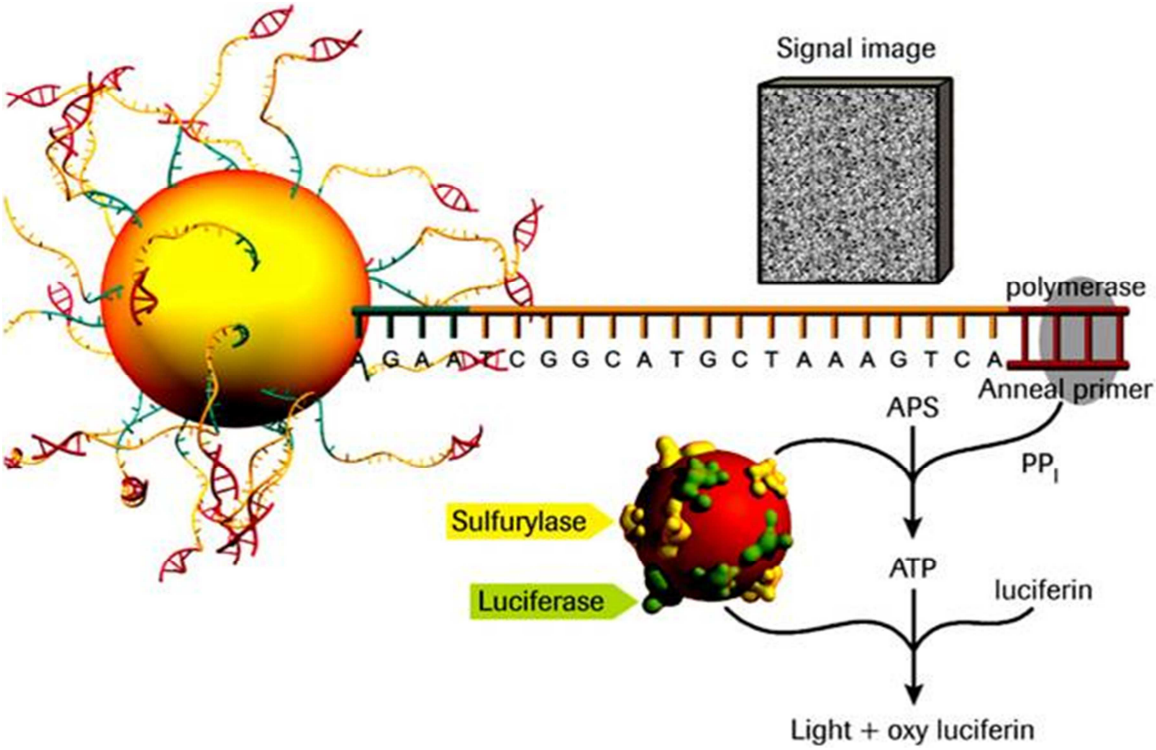
به طور کلی، توالی‌یابی قطعات DNA با استفاده از تکنیک‌های جدید توالی‌یابی (Next generation sequencing یا NGS)، بر خلاف توالی‌یابی به روش Sanger، نیازی به مراحل همسانه‌سازی ندارد؛ این مسأله، زمان و هزینه‌ی توالی‌یابی را به شدت کاهش داده است. از دیگر مزیت‌های این نوع توالی‌یابی، می‌توان به تولید میلیون‌ها توالی به طول متوسط ۷۰۰-۳۰ جفت باز (بسته به هدف مورد نظر و نوع سیستم استفاده شده) تنها در طی چند روز با دقت و صحت بالا (توالی‌یابی در مقیاس وسیع) اشاره نمود. این ویژگی‌ها باعث شد تا این تکنولوژی جایگزین روش توالی‌یابی Sanger شود و اغلب آزمایشگاه‌ها بتوانند به طور مستقل از مراکز توالی‌یابی ژنومی بزرگ از آن بهره‌برداری کنند (۹).

در کنار مزایای ارزشمند تکنیک‌های NGS، آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی که طول کوتاهی دارند، بزرگ‌ترین چالش در این زمینه می‌باشد که نیازمند کامپیوترهای پیشرفته، نرم‌افزارهای خاص برای آنالیز داده‌ها، همچنین دانش و تخصص کافی است (۱۰). نسل جدید دستگاه‌های توالی‌یابی در اواخر دهه‌ی ۱۹۹۰ توسط شرکت‌های مختلف نظیر Illumina/Solex، Roch/454 Life science و ABI/SOLiD ایجاد و طی سال‌های ۰۶-۲۰۰۵ تجاری شدند.

تکنولوژی Roch/454 Life science

شرکت Roch/454 Life science اولین مؤسسه‌ی پیشگام در تولید و تجاری‌سازی تکنولوژی NGS می‌باشد. این شرکت، در اواخر دهه‌ی ۱۹۹۰ برای اولین بار از تکنولوژی موسوم به پایروسکوئنسینگ (Pyrosequencing) برای تعیین توالی DNA در مقیاس وسیع استفاده کرد. در این سیستم، نمونه‌ی DNA به قطعاتی با طول حدود ۱۰۰ جفت باز شکسته می‌شود. سپس، دو آداپتور کوتاه به انتهای قطعات متصل می‌شود. این آداپتورها، محل اتصال پرایمرهای لازم برای تکثیر و توالی‌یابی هستند. این قطعات، با ذرات کوچکی که پوششی از جنس استرپتاویدین در سطح خود دارند، مخلوط می‌شوند و به کمک آداپتور B خود که در انتهای ۵ بیوتینه است، به این ذرات متصل می‌گردند. آن گاه، قطعات دو رشته‌ای متصل به ذرات، دناتوره و تک رشته‌ای می‌گردند. این مخلوط، به اندازه‌ی کافی رقیق است؛ به طوری که به هر ذره‌ی منفرد، تنها یک رشته‌ی DNA متصل می‌باشد. سپس، با افزودن ترکیبات لازم برای تکثیر قطعات DNA متصل به ذرات، این مخلوط به امولسیون تبدیل می‌شود. به این ترتیب، هر ذره با رشته‌ی DNA متصل به آن، در یک قطره‌ی امولسیون به دام می‌افتد و واکنش Polymerase chain reaction (PCR) به طور مستقل در هر قطره انجام می‌گردد (Emulsion PCR).

در مرحله‌ی بعد، به منظور تعیین توالی، ذرات حاوی DNA بر روی صفحه‌ی سلیکونی متشکل از ۴۰۰۰۰۰۰ چاهک منظم با حجمی در حد پیکولیتر پخش می‌شوند (۱۱). اندازه‌ی کوچک چاهک، باعث می‌شود تا در هر چاهک بیش از یک ذره قرار نگیرد (شکل ۱). سپس آنزیم‌های لازم یعنی DNA پلیمراز، سولفوریلاز و لوسیفراز به چاهک افزوده می‌شوند. چاهک‌ها به طور مجزا پی در پی در معرض Deoxycytidine triphosphate (dCTP)، dTTP (Deoxythymidine triphosphate)، dGTP (Deoxyguanosine triphosphate) و Deoxyadenosine triphosphate (dATP) قرار می‌گیرند و بین هر بار افزودن سوبسترای دئوکسی نوکلئوتید، یک مرحله‌ی شستشو انجام می‌شود. بدیهی است که ورود هر نوکلئوتید به رشته‌ی در حال گسترش، وابسته به حضور باز مکمل در الگو می‌باشد. با ورود هر نوکلئوتید مکمل، یک مولکول پیروفسفات رها می‌شود. آنزیم سولفوریلاز، این مولکول پیروفسفات را با استفاده از آدنوزین فسفوسولفات (Adenosine phosphosulfate یا APS) به ATP تبدیل می‌کند. آنزیم لوسیفراز نیز به کمک ATP حاصل شده، سوبسترای خود را که لوسیفرین می‌باشد، به اکسی لوسیفرین تبدیل می‌کند. این واکنش همراه با ساطع شدن نور می‌باشد. نور ساطع شده توسط دوربین‌های متصل به صفحه‌ی سلیکونی ثبت و به صورت پیک در یک گراف نمایان می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱. تعیین توالی با تکنولوژی ۴۵۴ (۵۷)

رونقی و همکاران، در سال ۱۹۹۸ از پایه‌گذاران پایروسکوئنسینگ بودند (۱۲). در آخرین نسخه‌ی ارایه شده از طرف شرکت Roch، این تکنولوژی می‌تواند تا ۱۴ گیگا باز (Giga bases; Gb) توالی با طول متوسط ۷۰۰ جفت باز تولید کند. طول بلند توالی‌های تولید شده توسط این روش و سرعت بالا، از مهم‌ترین ویژگی‌های این تکنولوژی می‌باشد. هر اجرای پایروسکوئنسینگ بسیار سریع است؛ در واقع، این تکنیک می‌تواند تعداد زیادی اجرا را به طور هم‌زمان انجام دهد. به عنوان مثال، ۹۶ اجرای مختلف می‌تواند به طور هم‌زمان در یک پلیت ۹۶ چاهکی انجام شود، از آن جایی که کل فرایند اتوماتیک است، نیاز چندانی به توجه فرد آزمایش کننده ندارد. بدیهی است هر تکنولوژی در کنار مزایای خود، یک سری معایب نیز دارد و یکی از معایب این روش، درصد خطای به نسبت بالای آن در نواحی هموپلیمر DNA است. هزینه‌ی بالای توالی‌یابی با این روش در مقایسه با سایر روش‌های توالی‌یابی در مقیاس وسیع، عیب دیگر این تکنولوژی به شمار می‌رود که استفاده از آن را تا حدی محدود می‌کند (۱۳).

تکنولوژی ۴۵۴، توالی‌های بلندتری را در مقایسه با روش‌های دیگر توالی‌یابی در مقیاس وسیع تولید می‌کند. این مسأله، دقت و سر هم نمودن این توالی‌ها را به توالی‌های بلندتر را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. با این وجود، چون تعداد خوانش‌های تولید شده در هر اجرای این دستگاه اندک است، استفاده از آن برای موجوداتی با اطلاعات ژنتیک محدود، مستلزم اجرای متعدد می‌باشد که از نظر اقتصادی چندان مقرون به صرفه نیست. در مقابل، این تکنیک ابزاری قدرتمند برای توالی‌یابی مجدد ژنوم‌های شناخته شده می‌باشد (۱۱). به عنوان مثال، این روش برای توالی‌یابی بخش‌هایی از ژن‌های یک شخص، به منظور تشخیص جهش های بیماری‌زا به خوبی عمل می‌کند. به منظور افزایش سرعت در این مورد، نوکلئوتیدها می‌توانند به همان ترتیبی که در توالی طبیعی شناخته شده وجود دارند، اضافه شوند. به این ترتیب، جهش از طریق عدم توانایی نوکلئوتید طبیعی برای اتصال در یک موقعیت خاص به سادگی تشخیص داده می‌شود (۱۰).

تکنولوژی Illumina/Solex

شرکت Solex که در سال ۲۰۰۶ دستگاه Genome analyzer را به بازار ارایه کرد که در سال ۲۰۰۷ توسط شرکت Illumina خریداری شد و از آن زمان به بعد با نام Illumina/Solex شناخته می‌شود. طول متوسط توالی‌های خوانده شده توسط این تکنولوژی، ۱۵۰-۳۷ جفت باز می‌باشد (۸). برای انجام توالی‌یابی به کمک این تکنولوژی، ابتدا DNA مورد نظر به قطعاتی با طول کمتر از ۸۰۰ جفت باز شکسته می‌شود. این قطعات، دارای انتهای صاف هستند و از دو طرف به آداپتورهایی متصل می‌شوند. فراورده‌های حاصل، پس از

دناتوره شدن از یک انتها با پرایمرهایی متصل (و مکمل با توالی آداپتور) به یک سطح جامد به نام Flow cell هیبرید می‌شوند و بر روی سطح تثبیت می‌شوند و از انتهای دیگر، با توالی مکمل دیگر در سطح Flow cell هیبرید می‌شوند و به این ترتیب، یک ساختار پل مانند شکل می‌گیرد که الگوی تکثیر در واکنش PCR است (Bridge PCR). پس از انجام واکنش PCR، در حدود ۲۰۰۰ کپی از قطعات DNA دو رشته‌ای بر روی سطح جامد تولید می‌شوند که به آن‌ها در اصطلاح خوشه (Cluster) گفته می‌شود (شکل ۲).

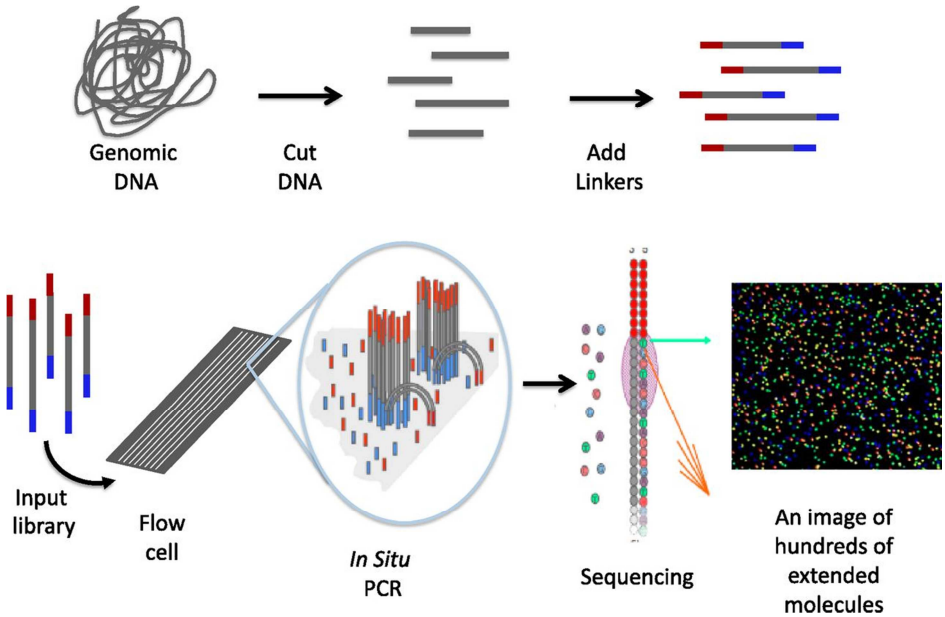
در مرحله‌ی بعد، به منظور تعیین توالی قطعات، مولکول‌های DNA دناتوره و خطی می‌شوند، پس از هیبریداسیون پرایمر مخصوص توالی‌یابی به توالی مکمل آداپتوری در انتهای هر رشته، Flow cell برای تعیین توالی در دستگاه مربوط آماده است. در هر چرخه‌ی توالی‌یابی، مخلوطی از چهار نوکلئوتید که هر کدام با رنگ فلورسنت مختلف نشانه‌گذاری شده‌اند (رنگ فلورسنت واجد یک گروه خاتمه دهنده‌ی سنتز زنجیره نیز می‌باشد)، به سطح Flow cell اضافه می‌شود. پس از شناسایی نوکلئوتید اضافه شده به رشته‌ی DNA در حال سنتز، رنگ فلورسنت به همراه گروه خاتمه دهنده از انتهای باز برداشته می‌شود و با اضافه شدن مخلوط نوکلئوتیدی به سطح، چرخه‌ی بعدی آغاز می‌گردد (شکل ۲).

به این ترتیب، در هر چرخه، تنها یک نوکلئوتید به رشته‌ی DNA در حال سنتز افزوده می‌شود (۱۴). بر خلاف تکنولوژی ۴۵۴، فرایند اضافه شدن بازها در این سیستم، به خوبی قادر به تعیین توالی DNA با دقت بالا در نواحی هموپلیمر و توالی‌های تکراری است. در اوایل سال ۲۰۱۰، Illumina سیستم Hiseq را به بازار ارایه کرد که از راهبرد پیش‌گفته، برای تعیین توالی استفاده می‌کند، اما خروجی آن در مقایسه با نسخه‌های قبلی بسیار بیشتر است. این سیستم در ابتدا در هر اجرا قادر به خواندن ۲۰۰ Gb توالی بود که به ۶۰۰ Gb افزایش یافته است (۱۵).

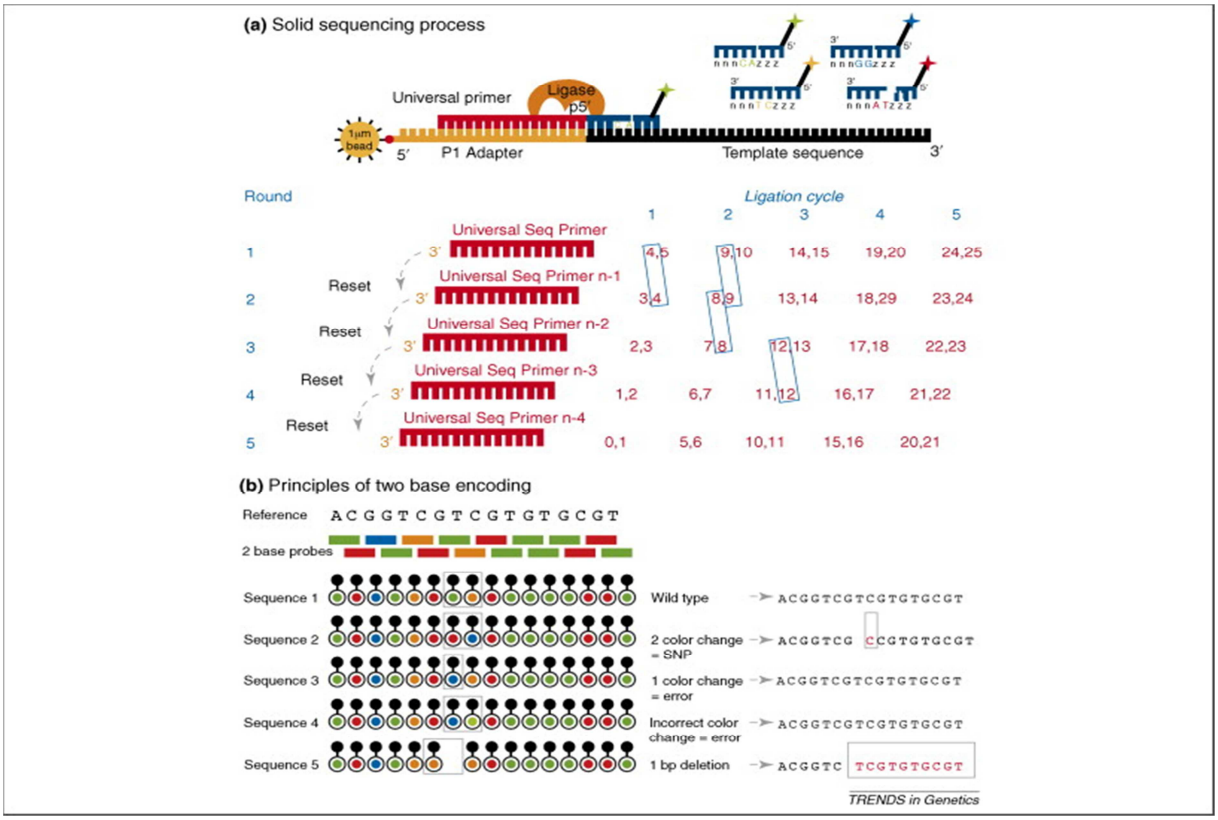
اگر چه طول کوتاه توالی‌های تولید شده توسط Illumina انجام آنالیزهای دقیق به ویژه در موجوداتی با اطلاعات ژنتیک بسیار کم را محدود می‌کند، اما قابلیت انجام توالی‌یابی در هر دو جهت مولکول DNA که به Paired-end sequencing معروف است، تا حد زیادی بر این مشکل غلبه کرده است؛ به طوری که امروزه اغلب با استفاده از این سیستم و در مواردی ترکیب دو سیستم ۴۵۴ و Illumina، ژنوم بسیاری از موجودات در حال توالی‌یابی است (۸).

تکنولوژی ABI/SOLiD

شرکت Sequencing by oligonucleotide Ligation and detection (SOLiD) در سال ۲۰۰۶، تکنولوژی توالی‌یابی از طریق اتصال (Sequencing by ligation) را به بازار معرفی کرد و در همین سال نیز توسط شرکت Applied biosystems (ABI) خریداری شد. با استفاده از این تکنولوژی، توالی‌هایی به طول ۷۵-۳۵ جفت باز خوانده می‌شود. مراحل آماده‌سازی نمونه‌ی DNA، به طور تقریبی مشابه با سیستم توالی‌یابی ۴۵۴ است؛ به طوری که نمونه‌ی DNA مورد نظر به قطعات کوچک‌تری (حدود ۲۰۰ جفت باز) شکسته می‌شود و پس از اتصال آداپتور به انتهای قطعات حاصل، این قطعات از طریق Emulsion PCR تکثیر می‌گردند (۸).



شکل ۲. تعیین توالی در تکنولوژی Illumina (۵۸)



شکل ۳. توالی‌یابی Applied biosystems/Sequencing by oligonucleotide ligation and detection (ABI/SOLiD sequencing) (۵۷)

در مرحله‌ی تعیین توالی، پرایمر توالی‌یابی که مکمل توالی آداپتور در انتهای قطعات DNA است، به این قطعات متصل می‌شود، سپس یک سری اکتامرهای اولیگو نوکلئوتیدی نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسنت، برای اتصال به پرایمر با یکدیگر رقابت می‌کنند. در این اکتامر، دو باز وسط (بازهای ۴و ۵) با یکی از چهار رنگ فلورسنت نشان‌دار شده است. به این ترتیب، پس از اتصال اکتامر به پرایمر این بازها شناسایی خواهند شد (۱۴). اکتامر اولیگو نوکلئوتیدی پس از باز پنجم شکسته می‌شود و رنگ فلورسنت نیز آزاد می‌گردد. سپس، با اتصال اکتامر دیگر چرخه‌های هیبریداسیون و اتصال تکرار می‌شوند تا بازهای ۹ و ۱۰ تعیین توالی شوند. در چرخه‌ی بعدی، بازهایی که در موقعیت‌های ۱۴ و ۱۵ قرار گرفته‌اند، توالی‌یابی می‌گردند. پس از یک سری چرخه های اتصال (Ligation)، قطعه‌ی مورد نظر با پرایمر مخصوص دیگری که مکمل موقعیت n-1 است، هیبرید می‌شود و دوباره، چرخه‌های اتصال اکتامر اولیگونوکلئوتیدی به پرایمر تکرار می‌گردد تا بازهای دیگر توالی‌یابی گردند. پس از ۵ دور هیبریداسیون پرایمرهای توالی‌یابی مختلف با قطعه‌ی مورد نظر و تکمیل تکرار چرخه‌های اتصال برای هر اکتامر اولیگو نوکلئوتیدی نشان‌دار، هر باز با استفاده از دو پرایمر توالی‌یابی و در طی دو واکنش اتصال مستقل توالی‌یابی می‌شود. این روش تعیین توالی در اصطلاح Two base encoding نامیده می‌شود (شکل ۳).

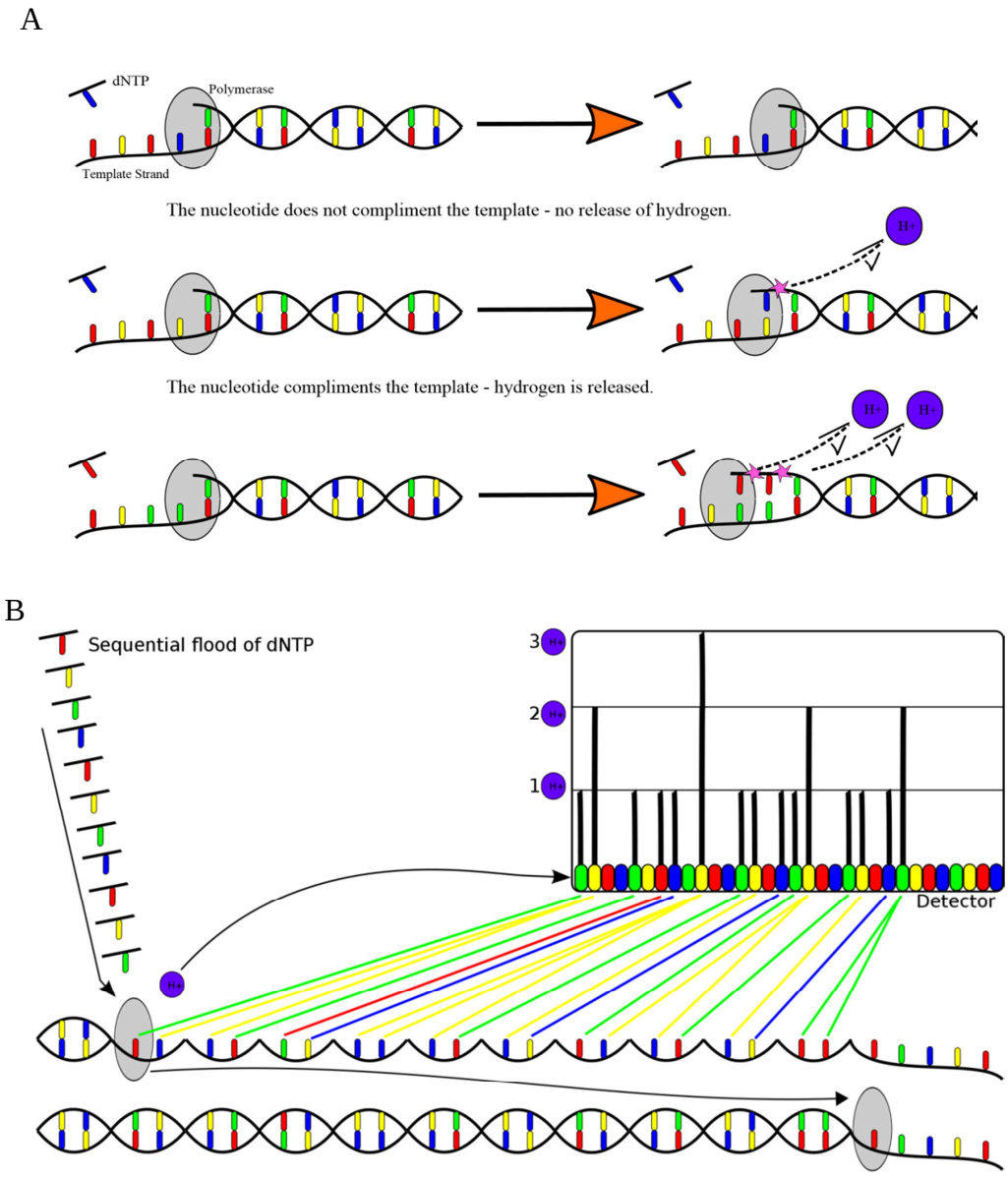
صحت توالی‌های خوانده شده با استفاده از این تکنولوژی، در مقایسه با سیستم های دیگر در سطح بالایی است. به کمک این روش تعیین توالی، می‌توان بین خطای توالی‌یابی (Sequencing error) و چند شکلی تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism) تمایز قائل شد. این تمایز با در نظر گرفتن این مسأله است که خطای توالی‌یابی تنها در یک واکنش تعیین توالی قابل ردیابی است، اما چند شکلی در هر دو واکنش شناسایی می‌شود. از این رو، دقت توالی‌یابی در این سیستم در مقایسه با سیستم‌های دیگر در سطح بالایی است. در ابتدا، در هر اجرای دستگاه تا Gb ۳ توالی خوانده می‌شد، اما در دسامبر ۲۰۰۹، نسخه‌ی جدیدی از این تکنولوژی تحت عنوان SOLiD™3 Plus Plus معرفی شد که قادر است در هر اجرا، بیش از Gb ۶۰ توالی را بخواند (۱۴).

تعیین توالی مولکول منفرد (Single molecule sequencing)

در حال حاضر، جدیدترین سیستم توالی‌یابی که به نسل سوم توالی‌یابی (Next- next- generation sequencing) معروف است، اولین بار توسط شرکت Helicos Bioscience معرفی شد و قادر به توالی‌یابی یک مولکول منفرد می‌باشد (۱۶). ویژگی‌های

ممتاز این تکنولوژی در مقایسه با تکنیک‌های نسل دوم توالی‌یابی، عدم نیاز به تکثیر DNA با واکنش PCR می‌باشد که باعث افزایش دقت و کاهش زمان لازم برای توالی‌یابی شده است؛ همچنین، قابلیت شناسایی نوکلئوتید اضافه شده به زنجیره‌ی در حال ساخت، در زمان واقعی (Real time) و بلافاصله پس از اضافه شدن از امتیازات این تکنیک می‌باشد. طول متوسط توالی‌های خوانده شده توسط این سیستم، ۱۳۰۰ جفت باز است که از طول توالی‌های خوانده شده توسط تمام دستگاه‌های نسل دوم بیشتر است. با این وجود، این تکنولوژی برای آزمایشگاه‌های کلینیک و به ویژه تحقیقات میکروبی و شناسایی پاتوژن ها، بسیار مناسب و کاربردی می‌باشد (۱۷).

شرکت Ion Torrent در اواخر سال ۲۰۱۰، دستگاهی موسوم به Ion personal genome machine (Ion PGM) را روانه‌ی بازار کردکه نوع دیگری از دستگاه نسل سوم توالی‌یابی است. در این تکنولوژی، به ازای اضافه شدن هر نوکلئوتید توسط پلیمراز به مولکول DNA، یک پروتون آزاد می‌گردد و pH محیط واکنش تغییر می‌یابد. به این ترتیب، تغییر pH توسط حس‌گرهایی ردیابی می‌شود و اضافه شدن نوکلئوتید و نوع آن را ردیابی می‌کند (شکل ۴) (۱۶).



شکل ۴. A) اضافه شدن نوکلئوتیدها به رشته‌ی در حال سنتز و آزاد شدن پروتون‌ها. B) تعیین توالی به وسیله‌ی تکنولوژی شرکت Ion Torren، ردیابی هر نوکلئوتید به وسیله‌ی حس‌گرهای ویژه (۸)

کاربردهای NGS

سرعت بالا و هزینه‌ی پایین توالی‌یابی با استفاده از این تکنیک، در مقایسه با روش تعیین توالی Sanger، کاربردهای فراوانی برای آن ایجاد کرده است که به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود (جدول ۱).

توالی یابی کل ژنوم به منظور دست یافتن به واریانت های مختلف مرتبط با بیماری‌ها

دست یافتن به واریانت های ژنتیک که افراد را نسبت به دیگر افراد جامعه مستعد ابتلا به یک بیماری می‌نماید، از ابتدا مورد توجه بوده است. مطالعه بر روی کل ژنوم از طریق توالی‌یابی، در ابتدا بر روی واریانت‌هایی که در جامعه شایع هستند (۵۰ درصد < MAF یا Minor allele frequency) انجام می‌گرفت (۱۸)، اما با دست‌یابی به روش‌های NGS و توالی‌یابی کل ژنوم از طریق آن، امکان بررسی واریانت‌هایی با فراوانی پایین‌تر (۱ درصد > MAF) و بر روی تعداد افراد بیشتری فراهم شد، به عنوان مثال در طرح ۱۰۰۰ ژنوم، واریانت‌هایی با فراوانی کمتر از ۱ درصد، مورد بررسی قرار گرفتند (۲۰-۱۹).

توالی‌یابی مناطق هدف (Targeted sequencing)

اگر چه توالی‌یابی کل ژنوم با استفاده از NGS روش بهینه و جامع‌تری برای آنالیز ژنوم می‌باشد، اما این تکنیک در بسیاری از آزمایشگاه‌ها تحقیقی و بالینی در دسترس نمی‌باشد (۲۱)، در نتیجه توالی‌یابی یک سری توالی‌های خاص که جهش یا تغییرات دیگر در آن‌ها موجب بیماری می‌شود، مورد توجه قرار گرفته است. امروزه، از پلت فرم‌های مختلف NGS به منظور Exome sequensing در بیماری‌هایی که چندین ژن مختلف مستعد برای جهش دارند و یا بدون نقاط Hot spot برای جهش می‌باشند، استفاده می‌شود (۲۳-۲۲، ۱۸). از این موارد، می‌توان به بیماری‌های نقص ایمنی و سرطان‌ها مانند کلورکتال و یا سینه اشاره نمود که می‌تواند حاصل جهش در یک سری ژن‌های هدف باشد و یا به عنوان مثال برای بررسی تغییر طول میکروستلایت‌ها (Microsatellite instability by next-generation sequencing یا mSINGS) در سرطان کلورکتال اشاره نمود که هم در تشخیص نوع سرطان و هم در درمان آن بسیار مفید می‌باشد (۲۵-۲۴).

تعیین توالی از نو و اسمبلی (De novo sequencing and Assembly)

توالی یابی از نو، به مفهوم تولید توالی اولیه‌ی ژنومی یا ترانسکریپتومی برای موجوداتی است که اطلاعات ژنتیک محدودی از آن‌ها در دسترس می‌باشد (۲۶).

جدول ۱. کاربردهایی از روش‌های نسل دوم توالی‌یابی

کاربرد	مثال کاربرد	منبع	سال
ژنوم	تعیین توالی از نو	Velasco و همکاران (۵۹)	۲۰۰۷
		Huang و همکاران (۶۰)	۲۰۰۹
		Li و همکاران (۶۱)	۲۰۱۰
	توالی‌یابی مجدد	Bentley (۲۶)	۲۰۰۶
		Ossowski و همکاران (۲۷)	۲۰۰۸
	توالی‌یابی کل ژنوم	Denver و همکاران (۶۲)	۲۰۰۹
ترانسکریپتوم	RNA-Seq	Wang و همکاران (۲۸)	۲۰۰۹
اپی‌ژنتیک	پروفایل ژنومی از تغییرات هیستون	Impey و همکاران (۵۳)	۲۰۰۴
		Mikkelsen و همکاران (۵۲)	۲۰۰۷
	متیلاسیون DNA	Cokus و همکاران (۶۳)	۲۰۰۸
		Costello و همکاران (۶۴)	۲۰۰۹
	پروفایل ژنومی از موقعیت نوکلئوزوم	Fierer و همکاران (۶۵)	۲۰۰۶
		Johnson و همکاران (۶۶)	۲۰۰۶
		Turnbaugh و همکاران (۶۷)	۲۰۰۷
		Qin و همکاران (۶۸)	۲۰۱۰
متاژنوم	فلور میکروبی محیطی	Edward و همکاران (۵۵)	۲۰۰۶
		Huber و همکاران (۵۴)	۲۰۰۷

این نوع توالی‌یابی در سطح ترانسکریپتوم به توالی‌یابی RNA معروف است. در سال ۲۰۰۷، توالی‌یابی ژنوم پیچیده و هتروزیگوت انگور با استفاده از ترکیب روش‌های Sanger و پایروسکوئنسینگ انجام شد. در این پروژه، برای اولین بار، توالی‌های خوانده شده با روش‌های Sanger و NGS، ژنوم پیچیده‌ی یوکاریوتی با موفقیت اسمبل شدند. در سال ۲۰۱۰، پیش‌نویسی از ژنوم Giant panda با استفاده از تکنولوژی NGS فراهم شد که توالی‌های هم‌پوشان اسمبل شده، حدود ۹۴ درصد ژنوم (۲/۲۵ Gb) را پوشش می‌دادند. به نظر می‌رسد که ۰/۰۵ Gb شکاف باقی مانده، مربوط به توالی‌های تکراری است. برای انجام این طرح‌ها به روش Sanger، علاوه بر هزینه‌ی بالا، زمان طولانی نیاز می‌باشد، اما با کاربرد نسل جدید روش‌های توالی‌یابی، با سرعت و هزینه‌ی کمتر، این طرح‌ها انجام می‌شود (۲۷).

تعیین توالی RNA (RNA-seq)

یکی از کاربردهای مهم و در حال گسترش تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی، توالی‌یابی RNA کل است. با استفاده از این تکنیک، امکان بررسی تمام انواع مختلف نسخه‌های موجود در سلول اعم از RNA کد کننده و غیر کد کننده وجود دارد. تکنیک توالی‌یابی RNA برای انجام مطالعات ژنتیک و مولکولی به ویژه در موجودات غیر مدل که اطلاعات ژنتیک بسیار اندکی از آن‌ها موجود است، بسیار حایز اهمیت و پر کاربرد می‌باشد (۲۸). با استفاده از این روش، تصویر به نسبت کاملی از یک نمونه‌ی بیولوژیک حاصل می‌شود که اطلاعات قابل استخراج از آن، در برخی موارد تا حد زیادی می‌تواند جایگزین توالی‌یابی کل ژنوم گردد. این در حالی است که روش Sanger، تنها قادر به شناسایی ۶۰ درصد از نسخه‌های موجود در سلول است. به منظور توالی‌یابی RNA، پس از تبدیل این مولکول به complementary DNA (cDNA)، اغلب از تکنولوژی‌های توالی‌یابی ۴۵۴ و Illumina استفاده می‌شود. به علت هزینه‌ی پایین‌تر و مقدار بیشتر توالی خوانده شده توسط Illumina، این تکنولوژی به ویژه در سال‌های اخیر مورد توجه محققان مختلف قرار گرفته است (۲۹).

توالی‌یابی RNA در بیماری‌هایی مانند سرطان‌ها در زمینه‌ی تشخیص بیان یک آلل خاص یا یک رونوشت به هم متصل (Fusion) که به طور اختصاصی در سلول سرطانی وجود دارد، از اهمیت بالایی برخوردار است (۳۰). به عنوان مثال، اتصال ژن‌ها به هم و ایجاد رونوشت‌های ادغام شده از ویژگی‌های بسیاری از سرطان‌های خونی و سرطان‌های بافت‌های نرم می‌باشد (۳۱) که به طور معمول، تشخیص این اتصال‌های ژنی با روش‌های سیتوژنتیک با محدودیت‌هایی روبه‌رو می‌باشد، اما می‌توان با توالی‌یابی کل RNA با روش‌های NGS به تمامی این بازآرایی‌ها پی برد (۳۳-۳۲). از آن جایی که برخی از این اتصالات ژنی، در فرایندهای سرطان‌زایی نقش دارند، از این رونوشت‌ها می‌توان به عنوان نشانگرهای تشخیصی و کمک کننده به تعیین نوع درمان نیز استفاده نمود که با توجه به کارامدی NGS در تعیین توالی RNA کل، می‌توان از آن به عنوان یک ابزار مناسب در تشخیص و کمک کننده به درمان یاد نمود (۳۴، ۱۸).

بررسی تغییرات اپی‌ژنتیک

ارتباط بین پروتئین و DNA یک برهم‌کنش بیولوژیک است که نقش عمده‌ای در قابل دسترس بودن DNA و تنظیم بیان ژن‌ها دارد. در سال‌های اخیر، برای بررسی پروفایل پروتئین‌های متصل شده به DNA در مقیاس ژنومی و همچنین، تغییرات پروتئین‌های هیستونی و نوکلئوزوم‌ها، از تکنیک Combining chromatin immunoprecipitation (ChIP-seq) استفاده می‌شود (۳۵). به این ترتیب که پس از رسوب‌دهی ایمونوکروماتینی و تفکیک پروتئین‌ها، DNA به کمک تکنیک NGS توالی‌یابی می‌گردد. از این جمله، می‌توان به مطالعات انجام شده با استفاده از تکنولوژی ۴۵۴ و تعیین جایگاه اتصال برخی عوامل نسخه‌برداری به DNA با استفاده از سیستم توالی‌یابی Illumina اشاره کرد (۳۶). در طرح ENCODE با استفاده از ChIP-seq، ۱۲ نوع تغییر هیستونی در ۴۶ رده‌ی سلولی مختلف تعیین شد (۳۷). به منظور نقشه‌یابی الگوی متیلاسیون ژنوم، از تکنیک‌های مختلف NGS مانند Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP-Seq)، MethylC-seq و Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) (۴۰-۳۸) استفاده می‌شود که یکی از کاربردهای بالینی آن، در تعیین الگوی متیلاسیون در ژن‌های مستعدی مانند MutL homolog 1 (MLH1) و MutS Homolog 2 (MSH2) در سرطان کلورکتال می‌باشد (۴۱).

توالی‌یابی تک سلول (Single-cell sequencing)

بسیاری از روش‌های توالی‌یابی، نیاز به DNA یا RNA حاصل از 10^5 سلول دارند (۴۳-۴۲) که این امر، در مورد بافت‌های سخت توموری که بسیار هتروژن و همچنین همراه سلول‌های سالم می‌باشند، مسأله‌ساز می‌باشد. در نتیجه، تشخیص سلول‌های اولیه و در واقع، تشخیص کلون‌های سرطانی مشکل می‌شود (۴۴)؛ اما امروزه، از آن جا که NGS به DNA اولیه‌ی پایینی نیاز دارد، می‌توان به صورت تک سلول به توالی‌یابی کل ژنوم پرداخت و به تعداد کلون‌های ایجاد کننده‌ی سرطان پی برد (۴۵). به عنوان مثال، اولین بار Navin و همکاران، با جدا نمودن ۱۰۰ سلول از بافت سرطان سینه و انجام توالی یابی تک سلولی، نشان دادند که تومور از ۳ کلون اولیه تشکیل شده است که این امر، در زمینه‌ی تشخیص و انتخاب روش درمانی مفید می‌باشد (۴۶). از دیگر کاربردهای توالی یابی کل ژنوم، می‌توان به توالی‌یابی تک سلول در Pre-implantation genetic diagnosis

(PGD) اشاره نمود (۴۷).

توالی‌یابی اسیدهای نوکلئیک آزاد موجود در خون و سایر مایعات بدن

DNA و RNAی آزاد در مایعات بدن به ویژه در خون، یک رویکرد جدید تشخیصی و پیش آگهی دهنده در زمینه‌ی بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان و یا تشخیص های پیش از تولد در بیماری‌های تک ژنی و یا کروموزومی می‌باشد (۴۹-۴۸). در گذشته، با جداسازی این اسیدهای نوکلئیک، مشکل بزرگ بررسی آن‌ها در درجه‌ی اول میزان پایین آن‌ها و سپس تعقیب تنها یک سری تغییرات و جهش‌های خاص در این اسیدهای نوکلئیک آزاد بود، اما امروزه، می‌توان با استفاده از توالی‌یابی کل DNA یا RNAی موجود در این مایعات، به روش NGS به راحتی هر گونه مشکلی را تشخیص داد (۵۰-۴۹).

کاربردهای دیگر

علاوه بر کاربردهای پیش‌گفته، از نسل جدید توالی‌یابی در بررسی‌های تعامل Long non-coding RNA (lnc-RNA) و کروماتین (Chromatin isolation by RNA purification seq یا ChIRP-seq)، تعیین نواحی باز یا در دسترس یوکروماتین (Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements یا DNAse-seq، FAIRE) و همچنین، بررسی پروفایل ژنومی موقعیت نوکلئوزوم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵۳-۵۱). از کاربردهای دیگر این تکنولوژی، می‌توان به حوزه‌ی متاژنومیک اشاره کرد (۵۶-۵۴).

References

1. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med 1944; 79(2): 137-58.
2. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 1953; 171(4356): 737-8.
3. Church G, Gilbert WC. Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81(7): 1991-5.
4. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74(2): 560-4.
5. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74(12): 5463-7.
6. Dovichi NJ. DNA sequencing by capillary electrophoresis. Electrophoresis 1997; 18(12-13): 2393-9.
7. Parker LT, Zakeri H, Deng Q, Spurgeon S, Kwok PY, Nickerson DA. AmpliTaq DNA polymerase, FS dye-terminator sequencing: analysis of peak height patterns. Biotechniques 1996; 21(4): 694-9.
8. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet 2008; 9: 387-402.
9. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol 2008; 26(10): 1135-45.
10. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol 2012; 2012: 251364.
11. Maricic T, Paabo S. Optimization of 454 sequencing library preparation from small amounts of DNA permits sequence determination of both DNA strands. Biotechniques 2009; 46(1): 51-7.
12. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science 1998; 281(5375): 363, 365.
13. Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. Genome Biol 2007; 8(7): R143.
14. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. N Biotechnol 2009; 25(4): 195-203.
15. Liu L, Hu N, Wang B, Chen M, Wang J, Tian Z, et al. A brief utilization report on the Illumina HiSeq 2000 sequencer. Mycology 2011; 2(3): 169-91.
16. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics 2012; 13: 341.
17. Daum LT, Rodriguez JD, Worthy SA, Ismail NA, Omar SV, Dreyer AW, et al. Next-generation ion torrent sequencing of drug resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis strains. J Clin Microbiol 2012; 50(12): 3831-7.
18. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. Cancer Lett 2013; 340(2): 284-95.
19. Kaiser J. A Plan to Capture Human Diversity in 1000 Genomes. Science 2008; 319(5862): 395.
20. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature 2010; 467(7319): 1061-73.
21. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. Nat Methods 2010; 7(2): 111-8.
22. Zhang W, Cui H, Wong LJ. Application of next generation sequencing to molecular diagnosis of inherited diseases. Top Curr Chem 2014; 336: 19-45.
23. Clark MJ, Chen R, Lam HY, Karczewski KJ, Chen R, Euskirchen G, et al. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies. Nat Biotechnol 2011; 29(10): 908-14.
24. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. Clin Chem 2014; 60(9): 1192-9.

25. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA 2006; 295(12): 1379-88.
26. Bentley DR. Whole-genome re-sequencing. Curr Opin Genet Dev 2006; 16(6): 545-52.
27. Ossowski S, Schneeberger K, Clark RM, Lanz C, Warthmann N, Weigel D. Sequencing of natural strains of Arabidopsis thaliana with short reads. Genome Res 2008; 18(12): 2024-33.
28. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet 2009; 10(1): 57-63.
29. Pease J, Sooknanan R. A rapid, directional RNA-seq library preparation workflow for Illumina[reg] sequencing. Nat Meth 2012; 9(3).
30. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. Nature 2009; 458(7239): 719-24.
31. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. Nat Rev Cancer 2007; 7(4): 233-45.
32. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. Nature 2009; 458(7234): 97-101.
33. Pflueger D, Terry S, Sboner A, Habegger L, Esgueva R, Lin PC, et al. Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. Genome Res 2011; 21(1): 56-67.
34. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. Nature 2011; 471(7338): 377-81.
35. Furey TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. Nat Rev Genet 2012; 13(12): 840-52.
36. Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. Nat Rev Genet 2009; 10(10): 669-80.
37. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 2012; 489(7414): 57-74.
38. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature 2009; 462(7271): 315-22.
39. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res 2005; 33(18): 5868-77.
40. Taiwo O, Wilson GA, Morris T, Seisenberger S, Reik W, Pearce D, et al. Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations. Nat Protoc 2012; 7(4): 617-36.
41. Tafe LJ. Targeted next-generation sequencing for hereditary cancer syndromes: A focus on lynch syndrome and associated endometrial cancer. J Mol Diagn 2015; 17(5): 472-82.
42. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 2010; 11(1): 31-46.
43. Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J. The next-generation sequencing technology and application. Protein Cell 2010; 1(6): 520-36.
44. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. Biochim Biophys Acta 2010; 1805(1): 105-17.
45. Schubert C. Single-cell analysis: The deepest differences. Nature 2011; 480(7375): 133-7.
46. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. Nature 2011; 472(7341): 90-4.
47. Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT, Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. Fertil Steril 2013; 99(5): 1377-84.
48. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. Sci Transl Med 2012; 4(136): 136ra68.
49. Mosallayi M, Salehi R. Fetal cells in maternalbBlood: Technical and clinical aspects. J Isfahan Med Sch 2015; 32(313): 2165-73. [In Persian].
50. Shea JL, Diamandis EP, Hoffman B, Lo YM, Canick J, van den Boom D. A new era in prenatal diagnosis: the use of cell-free fetal DNA in maternal circulation for detection of chromosomal aneuploidies. Clin Chem 2013; 59(8): 1151-9.
51. Soon WW, Hariharan M, Snyder MP. High-throughput sequencing for biology and medicine. Mol Syst Biol 2013; 9: 640.
52. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. Nature 2007; 448(7153): 553-60.
53. Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM, et al. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. Cell 2004; 119(7): 1041-54.
54. Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere. Science 2007; 318(5847): 97-100.
55. Edwards RA, Rodriguez-Brito B, Wegley L, Haynes M, Breitbart M, Peterson DM, et al. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. BMC Genomics 2006; 7: 57.
56. Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palu G. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. J Clin Virol 2013; 58(2): 346-50.
57. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet 2008; 24(3): 133-41.
58. Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. Blood 2013; 122(19): 3268-75.
59. Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS One 2007; 2(12): e1326.
60. Huang dW, Sherman BT, Zheng X, Yang J, Imamichi T, Stephens R, et al. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. Curr Protoc Bioinformatics 2009; Chapter 13: Unit.
61. Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Qing D, Wu T, et al. Relationship between urine bisphenol-A level and

declining male sexual function. J Androl 2010; 31(5): 500-6.
62. Denver DR, Dolan PC, Wilhelm LJ, Sung W, Lucas-Lledo JI, Howe DK, et al. A genome-wide view of Caenorhabditis elegans base-substitution mutation processes. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(38): 16310-4.
63. Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. Nature 2008; 452(7184): 215-9.
64. Costello AB. Getting the most from your analysis. Pan 2009; 12(2): 131-46.
65. Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(3): 626-31.
66. Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. Blood 2013; 122(19): 3268-75.
67. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. Nature 2007; 449(7164): 804-10.
68. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 2010; 464(7285): 59-65.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 05.09.2015
Vol. 33, No. 368, 4th Week, March 2016
Accepted: 11.01.2016

Next-Generation Sequencing and its Applications

Meysam Mosallayi[1], Hamed Mirzaei MSc[2], Miganoosh Simonian[1], Majid Kheirollahi PhD[3]

Review Article

Abstract

DNA sequencing is an approach exploited to determine the sequence of a DNA molecule. It includes any method or technology used to identify and determine the order of the four bases of adenine, guanine, cytosine, and thymine in a strand of DNA. DNA sequencing might be used to determine the sequence of individual genes, larger genetic regions, full chromosomes, or entire genomes. Traditional sequencing methods are mainly based on the original Sanger sequencing technique which makes them very expensive and low-throughput; thus, they do not meet the needs of researchers. Consequently, with the considerable advances in molecular biology and the high demand for low-cost sequencing has encouraged the development of high-throughput sequencing (or next-generation sequencing) technologies that parallelize the sequencing process, producing thousands or millions of sequences concurrently. Next-generation sequencing enable us to rapidly sequence a large piece of DNA which could span the whole genome with the latest instruments capable of producing gigabases of data in one isolated sequencing run. Next-generation sequencing platforms have a wide variety of applications, such as whole-genome sequencing, de novo sequencing, RNA sequencing (for applications such as transcriptomics and small RNA analysis), methylation analysis, and protein-nucleic acid interaction analysis.

Keywords: Sequencing, Next-generation sequencing, 454, Solex, Sequencing by oligonucleotide ligation and detection (SOLiD)

Citation: Mosallayi M, Mirzaei H, Simonian M, Kheirollahi M. **Next-Generation Sequencing and its Applications.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(368): 2469-80

1- MSc Student, Pediatric Inherited Disease Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Diseases AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2-PhD Student, Biotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3- Associate Professor, Pediatric Inherited Disease Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Diseases AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Majid Kheirollahi PhD, Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

Editorial Board (In alphabetical order)

1. **Mojtaba Abtahi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada
3. **Mohammad Esmaeil 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, Leuis 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 Barekatain** 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 Esmaeil 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 Ophtalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Marjane Foladi** PhD of Nursing, University of Flourida, 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 Razmju** MD, Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
41. **Mohammad Reza Safavi** MD, Assistant Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
42. **Reza Rouzbahani** MD, MPH, Assistant Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
43. **Mansour Sholevar** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
44. **Masoud Soheilian.** MD, Professor of Ophthalmology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

Vol. 33, No. 368, 4th Week March 2016

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible**: Mansour Sholehvar MD** Emerita Editor-in-Chief**: Roya Kelishadi MD**

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

Associate Editor: **Maryam Radahmadi PhD**

Published by:
Isfahan University of Medical Sciences
E-mail: publications@mui.ac.ir

Office:
P.O. Box 81744-176, Isfahan, I.R. IRAN
Telefax: +98 31 37922291
E-mail: jims@med.mui.ac.ir
Website: http://www.journals.mui.ac.ir/jims
Office Secretary: Golnaz Rajabi

Copy edit, Layout edit, Design and Print:
Farzanegan Radandish Co.
P.O. Box 81465-1798, Isfahan, I.R. IRAN
Telefax: +98 31 36686302
E-mail: esfahanfarzanegan@yahoo.com
f.radandish@gmail.com
www.farzaneganco.ir
Circulation: 500

This journal is indexed in the following international indexers

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

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

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