دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

JOURNAL OF ISFAHAN MEDICAL SCHOOL

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

هفته‌نامه

سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/ هفته دوم شهریور ۱۳۹۳

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

Weekly Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014

مقاله‌های پژوهشی

بهینه نمودن رنگ آمیزی اکریدین اورنج جهت ارزیابی تأثیر حفاظتی زعفران و ویتامین E بر ساختار DNA هسته‌ی اسپرم رت ۱۰۶۱
دکتر شهناز رضوی، سید احمد واعظ، دکتر محمد مردانی

بررسی جهش در اگزون‌های ۸ و ۳ ژن SLC ۳A۱ و اگزون‌های ٤ و ۱۰ ژن SLC ۷A۹ در بیماران مبتلا به سیتینوری در ایران ۱۰۷۳
لیلا کولیوند، دکتر مهرداد محمدی، دکتر رسول صالحی، بهروز عزت‌پور، دکتر مجید خیراللهی

مهار رشد رده‌ی سرطانی K٥٦٢ در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی ۱۰۸۱
مرضیه باقری، دکتر مهدی محمدزاده، دکتر امیر توکمه‌چی

ارتباط شاخص توده‌ی بدنی و افزایش وزن مادر با نتایج بارداری ۱۰۹۳
زهرا یزدان پناهی، صدیقه فروهری، امیرحسین بابائی، محبوبه حاجی فقها

مقاله کوتاه

بررسی خصوصیات اپیدمیولوژیک و میزان بروز بیماری تب مالت طی یک دوره‌ی ١٤ ساله در شهرستان تیران و کرون، اصفهان ۱۱۰۳
مهدی محمدیان، عبداله محمدیان هفشجانی

Original Articles

Optimizing Acridine Orange Staining for Assessment of Protective Effects of Saffron and Vitamin E on Rat Sperm DNA Structure 1072
Shahnaz Razavi PhD, Sayyed Ahmad Vaez MSc, Mohammad Mardani PhD

Detection of Mutation in Exons 3 and 8 of SLC3A1 and Exons 4 and 10 of SLC7A9 Genes in Patients with Cystinuria in Iran 1080
Leila Koulivand, Mehrdad Mohammadi MD, Rasoul Salehi MD, Behrouz Ezatpour MSc, Majid Kheirollahi PhD

In-Vitro Growth Inhibition of K562 Cell Line with Cell Wall Protein Fraction of Lactobacillus Casei and Lactobacillus Paracasei 1092
Marzieh Bagheri, Mehdi Mohammadzadeh PhD, Amir Tukmechi PhD

Relationship of the Maternal Body Mass Index and Gestational Weight Gain with Outcomes of Pregnancy ... 1102
Zahra Yazdanpanahi MSc, Sedigheh Foruhari MSc, Amirhossein Babaei, Mahboubeh Hajifoghaha MSc

Short Communication

Epidemiological Characteristics and Incidence Rate of Brucellosis Over A Period of 14 Years in the Tiran-Karvan Township, Isfahan, Iran 1109
Mahdi Mohammadian MSc, Abdollah Mohammadian-Hafshejani MSc

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۹۳)، هفته دوم شهریور ۱۳۹۳

صاحب امتیاز:

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی استان اصفهان

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

سردبیر: دکتر مجید برکتین

معاون سردبیر: دکتر رضا روزبهانی

ناشر:
انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
E-mail: publications@mui.ac.ir
دفتر مجله: دانشکده پزشکی صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶
مسؤول دفتر: گلناز رجبی
تلفن: ۶۶۹۴۷۳۷-۰۳۱۱ **دورنگار:** ۷۹۲۲۲۹۱-۰۳۱۱
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: ۶۶۸۶۳۰۲-۰۳۱۱

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	دانشیار، 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 نویسندگان مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱- **اهداف و چشم انداز:** مجله دانشکده پزشکی اصفهان به صورت هفته‌نامه و تحت حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتشر می‌گردد.

۲- این مجله مقالات اصلی و پژوهشی، مروری، مقالات کوتاه، مقالات دارای امتیاز بازآموزی و نامه به سردبیر را منتشر می‌نماید و همچنین فیلم‌های آموزشی تهیه شده توسط محققین را بر روی وب سایت مجله قرار می‌دهد.

۳- **پذیرش دست‌نوشته:** پذیرش دست نوشته‌ها و پیگیری‌های بعدی در این مجله فقط از طریق وب سایت اختصاصی آن به آدرس http://www.journals.mui.ac.ir/jims و پس از ثبت نام (Registration) در آن ممکن می‌باشد. همراه دست نوشته باید یک نامه تایپ شده (Covering letter) به سردبیر، شامل عنوان و اسامی نویسنده یا نویسندگان و اعلام این که این دست نوشته در مجلات دیگر چاپ نشده است و یا همزمان در حال بررسی نمی‌باشد، ارسال گردد.

۴- دست‌نوشته باید توسط نرم‌افزار MS Word در سایز A_4 و فاصله خطوط دو برابر (Double Spaced) با حاشیه‌های ۲/۵ سانتی‌متری تهیه شوند. جداول بدون حاشیه خارجی و تصاویر در فرمت GIF و JPEG و در تعداد محدود باشند. ارسال مدارک با فرمت PDF به هیچ عنوان پذیرفته نیست.

۵- دست نوشته باید شامل صفحه عنوان، چکیده، مقدمه ، روش‌ها، یافته‌ها، بحث، تقدیر و تشکر و منابع باشد.
صفحه عنوان: این صفحه بایدشامل عنوان کامل،عنوان مکرری، اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان و همچنین آدرس، تلفن، فاکس و پست الکترونیکی نویسنده مسؤول باشد. ذکر منابع مالی و اعتباری طرح پژوهشی در این صفحه ضروری است.

۶- **چکیده:** تمام مقالات اصلی باید دارای چکیده مقاله به دو زبان فارسی و انگلیسی با حداکثر ۲۵۰ کلمه باشد. چکیده باید شامل بخش‌های سابقه علمی موضوع، روش‌ها، یافته‌ها و بحث باشد. در پایان چکیده مقاله ۵-۳ کلمه کلیدی قرار می‌گیرد که تنها با استفاده از راهنمای MESH در آدرس (http://nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html) استخراج گردند.

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

۸- **روش‌ها:** این بخش شامل ارائه دقیق مشاهدات، مداخلات و روش‌های مورد استفاده در مطالعه است. اگر روش مورد استفاده شناخته شده است فقط منبع آن ذکر گردد اما اگر روشی نوین است، باید به صورتی توضیح داده شود که برای سایر محققان قابل درک و به طور عینی قابل انجام و تکرار باشد. در صورت استفاده از دستگاه و تجهیزات خاص باید نام، نام کارخانه سازنده و آدرس آن در پرانتز ذکر گردد. اگر از دارو در مطالعه استفاده شده است باید نام ژنریک، دوز و روش مصرف آن آورده شود. در مورد افراد و بیماران تحت مطالعه باید جنس و سن (همراه انحراف معیار) آورده شود. در مورد نرم‌افزارها و سیستم‌های کامپیوتری باید سال و ویرایش آن در پرانتز و پس از نام آن ذکر گردد. در صورتی که مطالعه دارای پرسش‌نامه یا چک لیست است، ضمیمه کردن آن لازم است؛ در مورد پرسش‌نامه‌های استاندارد ذکر نام و مرجع آن کافی است.

۹- **یافته‌ها:** این بخش به صورت متن همراه با جدول‌ها، شکل‌ها و نمودارها ارائه می‌گردد. محتوای جداول نباید به صورت کامل در متن ارائه شوند، بلکه کافی است با ذکر شماره جدول، شکل و یا نمودار به آنها اشاره شود. جدول‌ها، نمودارها و شکل‌ها هر کدام باید در یک صفحه جداگانه و پس از منابع، در پایان دست‌نوشته آورده شوند. در این بخش فقط یافته‌ها ارائه می‌شود و باید از ذکر دلایل و استدلال‌های مرتبط با آن خودداری گردد.

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

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

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

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

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

اگر منبع مورد نظر مقاله است:

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

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

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

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

اگر منبع مورد نظر کتاب است:

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

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

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

اگر منبع مورد نظر فصلی از کتاب است:

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

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

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

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

۱۷- 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.

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

۱۹- **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.

۲۰- **تداخل منافع (Conflict of Interest):** نویسنده یا نویسندگان باید هر گونه ارتباط مالی مانند دریافت هزینه، حق‌الزحمه، مواد و تجهیزات از دانشگاه‌ها، سازمان‌ها، نهادها، شرکت‌ها و سایر منابع که انتشار یافته‌های مطالعه می‌تواند به آنها سود یا زیان برساند را اعلام نمایند.

۲۱- **هزینه چاپ:** هیچ گونه هزینه‌ای برای چاپ مقالات در این مجله دریافت نمی‌شود.

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

۲۳- **فرآیند مرور دقیق (Peer Review):** تمام دست‌نوشته‌ها توسط حداقل ۳ نفر از داوران منتخب شورای نویسندگان مجله مورد بررسی دقیق قرار می‌گیرد. نویسنده‌ی 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.

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

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

فهرست مطالب

مقاله‌های پژوهشی

بهینه نمودن رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج جهت ارزیابی تأثیر حفاظتی زعفران و ویتامین E بر ساختار DNA هسته‌ی اسپرم رت.....۱۰۶۱

دکتر شهناز رضوی، سید احمد واعظ، دکتر محمد مردانی

بررسی جهش در اگزون‌های ۸ و ۳ ژن SLC۳A۱ و اگزون‌های ۴ و ۱۰ ژن SLC ۷A۹ در بیماران مبتلا به سیتینوری در ایران.....۱۰۷۳

لیلا کولیوند، دکتر مهرداد محمدی، دکتر رسول صالحی، بهروز عزت‌پور، دکتر مجید خیراللهی

مهار رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی.....۱۰۸۱

مرضیه باقری، دکتر مهدی محمدزاده، دکتر امیر توکمه‌چی

ارتباط شاخص توده‌ی بدنی و افزایش وزن مادر با نتایج بارداری.....۱۰۹۳

زهرا یزدان پناهی، صدیقه فروهری، امیرحسین بابائی، محبوبه حاجی فقها

مقاله کوتاه

بررسی خصوصیات اپیدمیولوژیک و میزان بروز بیماری تب مالت طی یک دوره‌ی ۱۴ ساله در شهرستان تیران و کرون، اصفهان.....۱۱۰۳

مهدی محمدیان، عبداله محمدیان هفشجانی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/هفته دوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۶

بهینه نمودن رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج جهت ارزیابی تأثیر حفاظتی زعفران و ویتامین E بر ساختار DNA هسته‌ی اسپرم رت

دکتر شهناز رضوی[۱]، سید احمد واعظ[۲]، دکتر محمد مردانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در دهه‌های اخیر، ارتباط بین غلظت ROS (Reactive oxygen species) و کیفیت مایع Semen مورد توجه قرار گرفته و تأثیر آن بر ناباروری در مطالعات متعددی بررسی شده است. زعفران نه تنها به عنوان یک افزودنی غذایی، بلکه به طور سنتی به عنوان یک گیاه دارویی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است، همواره مورد توجه بوده است. ویتامین E نیز آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است و قادر است سلول و اجزای آن را در مقابل هجوم آنتی‌اکسیدان‌ها محافظت نماید. هدف از این مطالعه، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی زعفران و ویتامین E در حفاظت از دناتوراسیون ساختار کروماتین اسپرم در مواجهه با اسید بود.

روش‌ها: تعداد ۳۰ رت نر بالغ ویستار به صورت اتفاقی و مساوی به سه گروه شاهد (۰/۵ cc/day آب مقطر روزانه)، زعفران (۱۰۰ mg/kg/day) و ویتامین E (۱۰۰ mg/kg/day) تقسیم شدند. پس از ۶۰ روز دوره‌ی تیمار، اپیدیدیم جدا شد و از اسپرم‌های ناحیه‌ی دم آن، جهت بررسی مقاومت ساختار DNA در مقابل اسید درجنت با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (OA یا Acridine orange) استفاده شد.

یافته‌ها: زعفران و ویتامین E باعث کاهش حساسیت DNA به آسیب توسط اسید درجنت می‌شوند ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود زعفران و ویتامین E به دلیل پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالای خود، قادر باشند ساختار کروماتین را از اثرات تخریبی اسید درجنت محافظت نمایند.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، زعفران، ویتامین E، آسیب DNA

ارجاع: رضوی شهناز، واعظ سید احمد، مردانی محمد. **بهینه نمودن رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج جهت ارزیابی تأثیر حفاظتی زعفران و ویتامین E بر ساختار DNA هسته‌ی اسپرم رت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ۱۰۷۲-۱۰۶۱

مقدمه

یکی از عوامل مهمی که در سال‌های اخیر به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است و می‌تواند باروری را متأثر کند، استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) است. استرس اکسیداتیو اختلالی است که با تولید بیش از حد مولکول‌های فعال ROS (Reactive oxygen species) و نارسایی سیستم آنتی‌اکسیدانی همراه است (۱).

۱- استاد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهناز رضوی
Email: razavi@med.mui.ac.ir

در سطح فیزیولوژیک، وجود ROS برای اسپرم و عملکردهای طبیعی آن مثل واکنش آکروزومی و ظرفیت پذیری لازم است. همچنین ROS برای فرایندهای تولید مثل مانند تعامل بین اسپرم و اووسیت، لانه‌گزینی و تکامل اولیه‌ی جنین حیاتی است (۲).

مشخص شده است که تولید بیش از حد ROS باعث قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. این تخریب، از طریق تغییر در بازهای آلی، شکستن پیوندهای عرضی بین دو رشته‌ی DNA و یا شکستگی در یک رشته‌ی DNA، حذف و یا آرایش مجدد کروموزومی رخ می‌دهد که می‌تواند به شکست لقاح منجر شود (۳).

ایجاد تراکم در کروماتین اسپرم یکی از استراتژی‌های اصلی حفظ کروماتین در برابر اثرات مخرب استرس اکسیداتیو است. در طول فاز اسپرمیوژنز، هیستون‌ها ابتدا توسط پروتئین‌های انتقالی و سپس توسط پروتامین‌ها (پروتئین‌های به شدت بازی و غنی از سیستئین/ آرژنین) جایگزین می‌شوند، در نتیجه کروماتین اسپرم به شدت فشرده می‌شود (۴).

حفظ تمامیت کروماتین، یک عامل اساسی و مهم در افزایش میزان باروری، کیفیت جنین و پیشبرد حاملگی است (۵). از جمله آزمایش‌هایی که جهت بررسی وضعیت ساختار کروماتین استفاده می‌شوند، کروموما‌یسین A_3، آکریدین اورنج، آنیلین بلو و تولوئیدین بلو را می‌توان نام برد که آزمایش‌های کارآمدی هستند (۷-۶).

همچنین از رنگ آکریدین اورنج (AO یا Acridine orange) جهت نشان دادن حساسیت DNA هسته‌ی اسپرم به دنیچره شدن توسط اسید استفاده می‌شود. در این روش، حساسیت DNA به صورت تغییر رنگ از سبز در DNA سالم به نارنجی و قرمز در DNA آسیب دیده متغیر است. مونومرهای AO بر روی DNA دو رشته‌ای می‌نشینند. در حالی که تجمع AO روی DNA تک رشته‌ای قرار می‌گیرد (۹-۸).

استراتژی دیگر اسپرم در برابر هجوم رادیکال‌های آزاد، وجود سیستم آنتی‌اکسیدانی است (۱۰). ویتامین E (α-tocopherol) یک آنتی‌اکسیدان مهم و ضروری برای نگهداری روند اسپرماتوژنز پستانداران است. ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان قوی است که بر روی غشای سلولی حضور دارد و با شکستن زنجیره‌ی اکسیداتیو نقش مهمی در حفاظت از سلول بازی می‌کند (۱۱).

استفاده از گیاهان دارویی به طور روز افزونی در حال افزایش است. یکی از گیاهان دارویی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و در ایران تولید می‌شود، زعفران است که به دلیل رنگ، طعم و بوی خاص، از آن به عنوان یک افزودنی غذایی استفاده می‌گردد. زعفران (Crocus sativus L.) کلاله‌ی خشک شده‌ی گل زعفران است که متعلق به خانواده‌ی Iridaceae و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است (۱۲).

مطالعات قبلی طیف گسترده‌ای از اثرات دارویی زعفران و مواد مؤثر آن را نشان داده‌اند. برخی از اثرات درمانی زعفران و اجزای موجود در آن که مرتبط با این تحقیق است، عبارت از خواص آنتی‌اکسیدانی و از بین برنده‌ی رادیکال‌های آزاد، محرک قوای جنسی، اثر حفاظت ژنتیکی، ضد موتاسیون (۱۳)، بهبود مورفولوژی و تحرک اسپرم (۱۴) هستند.

در این مطالعه با القای آسیب DNA اسپرم توسط اسید دترجنت، میزان کارایی زعفران و ویتامین E به

عنوان آنتی‌اکسیدان‌های فعال در مقابله با این آسیب بررسی می‌شود. ارزیابی آسیب DNA با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج صورت می‌گیرد.

روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در این آزمایش ۳۰ رت نر بالغ ویستار، با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰–۱۸۰ g از مؤسسه‌ی انستیتو پاستور تهران خریداری شد. قبل از شروع مطالعه، به مدت ۱۰ روز حیوانات در شرایط مشابه دوره‌ی مطالعه نگهداری شدند.

رت‌ها به طور اتفاقی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم گردیدند. گروه اول روزانه ۱۰۰ mg/kg زعفران، گروه دوم روزانه ۱۰۰ mg/kg ویتامین E و گروه سوم (شاهد) روزانه ۰/۵ cc آب مقطر از طریق گاواژ به مدت ۶۰ روز دریافت کردند.

رت‌ها در شرایط استاندارد در قفس‌های مخصوص به ابعاد $20 \times 30 \times 40\ cm^3$ (هر ۵ رت در یک قفس)، در دمای ۲ ± ۲۱ °C و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شبانه‌روز همراه با دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان قرار گرفتند. پس از اتمام دوره‌ی درمان، رت‌ها ابتدا با کلروفرم بیهوش و سپس با روش قطع نخاع قربانی شدند.

آماده‌سازی زعفران و ویتامین E

زعفران مصرفی در این مطالعه از قائن خراسان تهیه گردید. ۱۰۰۰ mg کلاله‌ی خشک زعفران ابتدا آسیاب گردید و سپس به مدت حداقل ۲ ساعت با ۲۰ ml آب مقطر گرم مخلوط شد. محلول به دست آمده در دمای ۴ °C نگهداری شد و روزانه از آن برای درمان گروه زعفران استفاده گردید. ویتامین E (با نام (±)– α-Tocopherol analytical standard) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد.

تهیه‌ی اسپرم از اپیدیدیم

پس از قطع نخاع و قربانی کردن رت‌ها، به طور اپیدیدیم چپ خارج شد. انتهای دیستال دم اپیدیدیم جدا شد و در پتری دیش حاوی ۲ ml نرمال سالین ۳۷ °C قرار داده شد. برای خروج راحت‌تر اسپرم‌ها چندین برش در اپیدیدیم زده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور (۳۷ °C) قرار گرفت تا اسپرم‌ها از قطعات بافتی خارج شوند و سوسپانسیونی از اسپرم ایجاد شود. از این سوسپانسیون، جهت رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (AO) و بررسی پارامترهای اسپرم استفاده شد.

بررسی پارامترهای اسپرم

با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ فاز کنتراست، تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها بررسی شد.

تعداد اسپرم: سوسپانسیون اسپرم به نسبت ۱:۲۰ با نرمال سالین رقیق گردید. از سوسپانسیون حاضر مقدار ۱۰ µl بر روی لام نئوبار قرار گرفت و لامل روی آن گذاشته شد. به استثنای مربع وسط (مخصوص شمارش اریتروسیت یا Central erythrocyte counting area)، شمارش اسپرم در ۸ مربع بزرگ دیگر لام نئوبار انجام شد. عدد حاصل در ۱۰۴ × ۵ ضرب شد تا تعداد کل اسپرم به صورت تقریبی به دست آید (۱۵).

تحرک اسپرم: جهت بررسی تحرک اسپرم رت، یک قطره از سوسپانسیون اسپرم روی لام نئوبار گرم قرار گرفت و لاملی روی آن گذاشته شد. حداقل ۱۰ میدان میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ فاز

کنتراست و بزرگ‌نمایی ۲۰۰ × شمارش شد و درصد اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک محاسبه گردید (۱۶).

مورفولوژی اسپرم: بررسی با میکروسکوپ فاز کنتراست نمایی مناسب از نقص‌های مورفولوژیک اسپرم را فراهم می‌آورد (۱۷). تعداد حداقل ۲۰۰ اسپرم برای هر رت با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ × و لام نئوبار شمارش گردید. داده‌ها به صورت درصد اسپرم‌های طبیعی و غیر طبیعی با زیر گروه‌های ناهنجاری سر، ناهنجاری گردن و ناهنجاری دم نشان داده شد (۱۸).

بررسی ساختار کروماتین اسپرم

رنگ‌آمیزی AO بدون انکوباسیون محلول اسید درجنت: برای رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج پس از تهیه‌ی اسمیر با غلظت مناسب از سوسپانسیون اسپرم، ابتدا اسمیرها در فیکساتیو کارنوی (حداقل ۲ ساعت) فیکس شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با رنگ آکریدین اورنج ۰/۱۹ mg/ml تازه تهیه شده در بافر سیترات فسفات (pH ۲/۵، ۰/۳ M NaH_2PO_4 + ۵ ml ۰/۱ M Citric acid ۸۰ ml) انکوبه گردید. تمام اسمیرها در یک روز و توسط میکروسکوپ فاز کنتراست با فیلتر ۴۶۰ nm بررسی شدند. میزان نوردهی حداکثر به ۴۰ ثانیه برای بررسی هر فیلد محدود بود. رنگ سبز، مربوط به اسپرم‌های با DNA طبیعی و رنگ نارنجی تا قرمز، مربوط به DNA دنیچره بود. در مجموع، تعداد ۲۰۰ اسپرم برای هر نمونه بررسی گردید (۸).

رنگ‌آمیزی AO همراه با انکوباسیون محلول اسید درجنت: در این روش پس از فیکس کردن و قبل از رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج (AO)، اسمیرها ابتدا به مدت ۱ دقیقه با محلول اسید درجنت (pH۱/۲، ۱۰۰ Triton-X ۰/۱ درصد، ۰/۱۵ M NaCl، ۰/۰۸ N HCl) انکوبه شدند. پس از آن رنگ‌آمیزی با AO انجام شد.

آنالیز آماری

در این بررسی از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۷/۰ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) و به دنبال آن با آزمون Tukey مقایسه شدند. $P < ۰/۰۵۰$ بیانگر معنی‌داری داده‌ها بود.

یافته‌ها

پارامترهای اسپرمی

تعداد اسپرم: شمارش تعداد اسپرم رت‌های تیمار شده با زعفران و ویتامین E (گروه‌های مورد) در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

تحرک اسپرم: میانگین درصد اسپرم‌های متحرک در گروه ویتامین E و زعفران در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری داشت ($P \leq ۰/۰۰۱$). همچنین افزایش میانگین درصد اسپرم‌های متحرک در گروه زعفران در مقایسه با گروه ویتامین E نیز معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۰۷$) (جدول ۱).

مورفولوژی اسپرم: میانگین درصد کل ناهنجاری‌های اسپرم در گروه‌های زعفران و ویتامین E در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری داشت ($P \leq ۰/۰۰۱$). بررسی زیر گروه ناهنجاری‌های مورفولوژیک اسپرم نیز کاهش معنی‌دار را نشان داد. بدین صورت که مقدار P در زیر گروه سر و گردن اسپرم در گروه‌های مورد در مقایسه با گروه شاهد $P \leq ۰/۰۰۱$ و در زیر گروه ناهنجاری دم، در

گروه‌های زعفران و ویتامین E در مقایسه با گروه شاهد، به ترتیب برابر با P = ۰/۰۰۴ و P = ۰/۰۰۱ بود (جدول ۱).

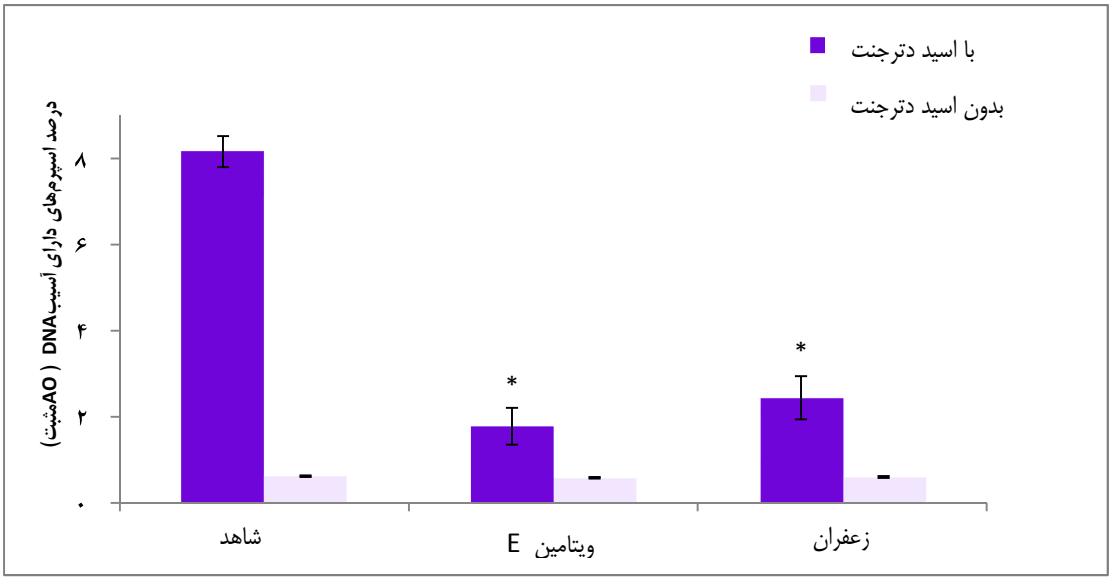
رنگ‌آمیزی AO بدون انکوباسیون با اسید دترجنت: میانگین درصد اسپرم‌های دارای آسیب DNA (AO مثبت) در گروه‌های شاهد، ویتامین E و زعفران به ترتیب ۰/۱۷ ± ۱/۰۰، ۰/۱۲ ± ۰/۷۱ و ۰/۱۶ ± ۰/۹۴ به دست آمد. هیچ اختلاف معنی‌داری در میانگین اسپرم‌های دارای آسیب DNA (AO مثبت) بین گروه شاهد و گروه‌های مورد مشاهده نگردید (شکل ۱).

رنگ‌آمیزی AO همراه با انکوباسیون با اسید دترجنت: میانگین درصد اسپرم‌های AO^+ در گروه شاهد ۱/۶۴ ± ۲۶/۹۸ بود که به ترتیب در گروه‌های ویتامین E و زعفران به ۰/۸۵ ± ۵/۸۲ و ۱/۱۳ ± ۶/۹۳ کاهش معنی‌دار داشت (P ≤ ۰/۰۰۱) (شکل ۱).

جدول ۱. میانگین درصد پارامترهای اسپرمی در گروه‌های مختلف

پارامترها	گروه‌ها		
	شاهد	ویتامین E	زعفران
تعداد اسپرم ($\times 10^6$)	۸۸/۷۳ ± ۱۰/۶۶	۱۱۲/۶۵ ± ۱۵/۲۸	۱۲/۴۰±۹۷/۴۰
تحرک اسپرم (درصد)	۵/۹۰ ± ۰/۶۱	۱۲/۵۱ ± ۱/۲۷**	۱۷/۹۵ ± ۱/۴۳**،*a
ناهنجاری‌های سر (درصد)	۱۲/۲۷ ± ۰/۵۹	۵/۲۸ ± ۰/۸۱**	۶/۱۶ ± ۰/۶۰**
ناهنجاری‌های گردن (درصد)	۲۵/۲۱ ± ۱/۷۹	۱۱/۱۳ ± ۱/۰۲**	۱۱/۶۳ ± ۰/۸۲**
ناهنجاری‌های دم (درصد)	۱/۷۸ ± ۰/۰۹	۰/۹۵ ± ۰/۱۱**	۱/۰۳ ± ۰/۲۱*
کل ناهنجاری (درصد)	۳۹/۲۸ ± ۱/۴۵	۱۷/۳۸ ± ۱/۵۰**	۱۹/۹۶ ± ۱/۳۳**

* P < ۰/۰۱۰ و ** P ≤ ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد، a: در مقایسه به گروه ویتامین E



شکل ۱. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج با و بدون انکوبه کردن با اسید دترجنت در گروه‌های مورد و شاهد

P ≤ ۰/۰۰۱ *

بحث

با وجود این که آنالیز پارامترهای سمن (semen) یک ابزار تشخیصی ارزشمند برای ارزیابی وضعیت باروری مردان است. پیش‌بینی باروری بالقوه تنها بر اساس آن چندان قابل اعتماد نیست. پارامترهای متداول مورد استفاده برای ارزیابی سمن دارای کاربرد محدودی هستند (۱۹). هر سلول اسپرم شامل بخش‌های ساختاری مختلفی است که دارای عملکردهای متفاوتی هستند و برای لقاح موفق، همه‌ی آن‌ها باید عملکرد صحیح داشته باشند (۲۰). بنابراین بررسی اسپرم از نظر پارامترهای مرسوم همراه با ارزیابی ساختارهای مهمی چون غشای پلاسمایی و کروماتین، کمک شایانی در تشخیص ناباروری با علل مردانه می‌کند.

عواملی که موجب کاهش کیفیت سمن می‌شوند، می‌توانند به مرگ جنین ختم شوند. ROS یکی از مواردی است که کیفیت سمن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در مواردی که بیش از حد طبیعی تولید شود، می‌تواند به اسپرم آسیب وارد کند. اسپرم آسیب دیده، می‌تواند با تخمک لقاح انجام دهد؛ اما تکامل رویان حاصل به میزان آسیب DNA بسیار وابسته است (۲۱). تولید تعداد کمتر اسپرم و تغییر در مورفولوژی آن می‌تواند در فردی که در معرض موتاژن‌ها قرار دارد، ایجاد شود (۲۲). ناهنجاری‌هایی مانند بسته‌بندی ضعیف کروماتین و آسیب DNA، با کیفیت پایین سمن همراه هستند (۲۳).

Bochenek و همکاران نشان دادند که وجود کروماتین غیر طبیعی در تعداد زیادی از اسپرم‌های گاو، موجب کاهش باروری می‌شود (۲۴). همچنین نشان داده شده است که بخشی از اسپرم‌های متحرک در افراد نابارور، دارای فراگمانتاسیون DNA هستند (۲۵). آسیب کروماتین اسپرم را می‌توان به وسیله‌ی آکریدین اورنج تشخیص داد؛ چرا که DNA دارای شکستگی، به شرایط اسیدی pH = ۱/۲ حساس است (۲۶).

عدم رنگ‌پذیری نمونه‌ها در شرایط متداول رنگ‌آمیزی AO، می‌تواند به علت اختلاف ساختار غشای سلولی نمونه‌های رت با انسان باشد. از این رو، هنگام استفاده از محلول اسید دترجنت که حاوی Triton-X ۱۰۰ می‌باشد، این شرایط غشا را نسبت به رنگ نفوذ پذیرتر می‌کند و رنگ AO به کروماتین دسترسی خواهد داشت و با قرارگیری به صورت مجتمع بر روی شکستگی‌های DNA، آسیب را بیشتر نمایان می‌سازد.

با این حال، می‌توان احتمال دیگری نیز در نظر گرفت. حضور محلول اسید دترجنت یک عامل آسیب رساننده‌ی قوی به غشا و کروماتین است. قرارگیری محلول اسیدی مجاور کروماتین باعث شکستگی‌های وسیع در DNA اسپرم می‌گردد. این آسیب در گروه شاهد بسیار شدید است و می‌توان چنین نتیجه گرفت که تغذیه‌ی رت‌ها با زعفران و ویتامین E موجب مقاوم‌تر شدن کروماتین در برابر آسیب اکسیدان‌ها می‌گردد.

اختلال در تمامیت ساختار کروماتین می‌تواند به صورت شکستگی‌های تک رشته‌ای و دو رشته‌ای مشخص گردد که باعث ایجاد قطعات دنیچره‌ی تک رشته (SSDNA یا Single strand DNA) می‌شود. این مورد باعث ایجاد رنگ قرمز در حضور آکریدین اورنج و در طول موج ۴۸۸ nm می‌شود که مشخص کننده‌ی اتصال آکریدین اورنج به SSDNA است. در حالی که وقتی آکریدین اورنج به DNA دو رشته‌ای

(DSDNA یا Double strand DNA) متصل می‌شود، رنگ سبز تولید می‌کند (۲۶).

در طول روند اسپرمیوژنز، هیستون‌ها توسط پروتامین جایگزین می‌شوند. این بازآرایی، کروماتین را در برابر عواملی مانند دترجنت‌ها، اسیدها، DNaseها و پروتئازها مقاوم می‌سازد (۲۷).

در برابر هجوم رادیکال‌های آزاد، وجود سیستم آنتی‌اکسیدانی و تراکم کروماتین اسپرم دو مکانیسم مؤثری هستند که اجزای سلولی اسپرم را محافظت می‌نمایند.

از طرف دیگر، هنگامی که ROS بیش از حد تولید شود، سیستم آنتی‌اکسیدانی قادر به مقابله با آن نیست و در نتیجه، منجر به ایجاد شرایطی به نام استرس اکسیداتیو می‌شود. تمام اجزای سلولی هدف بالقوه‌ای برای استرس اکسیداتیو محسوب می‌شوند (۲۹-۲۸، ۱). از سوی دیگر، حدود ۲۵ درصد از مردان نابارور، مبتلا به ناباروری با علت ناشناخته هستند و آنالیز مایع سمن آن‌ها دارای مقادیر غیر طبیعی ROS است (۳۰).

مشخص شده است که آسیب DNA اسپرم می‌تواند با کیفیت پایین تکامل جنین در مراحل بعدی همراه باشد (۳۱، ۸). نصر اصفهانی و همکاران نشان دادند که بین آزمایش‌های بلوغ هسته‌ی اسپرم و میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی، ارتباط معنی‌داری وجود دارد و از طریق بررسی وضعیت کروماتین اسپرم، می‌توان شانس موفقیت در لقاح آزمایشگاهی را پیشگویی کرد (۸).

به علاوه، مشخص گردیده است که آسیب DNA اسپرم و کمبود پروتامین علاوه بر میزان موفقیت در لقاح به طریق ICSI (Intra-cytoplasmic sperm injection)، بر تکامل جنین نیز تأثیر دارد؛ به طوری که جنین‌هایی که از اسپرم‌های دارای آسیب DNA بالا ایجاد می‌شوند، پتانسیل کمتری جهت رسیدن به مرحله‌ی بلاستوسیست را دارند (۳۲). استرس اکسیداتیو می‌تواند با تغییر، جابه‌جایی، ایجاد سایت‌های آزاد و حذف بازها موجب آسیب DNA شود (۳). اگر آسیب جزیی باشد، اسپرم (همچنین تخمک) قادر است آن را اصلاح نماید (۲۹)؛ اما در آسیب‌های گسترده، آپوپتوز و تکه تکه شدن جنین (Embryo fragmentation) می‌تواند رخ دهد (۳۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند DNA و دیگر اجزای سلولی را محافظت نمایند و از این طریق، کیفیت مایع سمن را بهبود بخشند (۳۴). در سال‌های اخیر، توجهات به سمت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های غذایی و گیاهان دارویی متمرکز شده است. از خصوصیات زعفران و عناصر سازنده‌ی آن، تحریک میل جنسی، بهبود عملکرد ارکشن و افزایش کیفیت مایع سمن است که در طب سنتی از آن برای درمان ناتوانی‌های جنسی استفاده می‌شده است (۳۵، ۱۴).

ویتامین E نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان اندوژن و همچنین آنتی‌اکسیدان رژیم غذایی (مکمل غذایی)، با عملکرد طبیعی سیستم تولید مثل مذکر مرتبط است و همچنین اسپرم و ساختار سلولی آن را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۳۶). ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان لیپوفیلیک است که بر روی غشای سلول قرار دارد و نقش مهمی در حفاظت سلول علیه اکسیدان‌ها بر عهده دارد (۳۷).

زعفران نیز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی است که این اثرات به دلیل وجود عناصر کاروتنوئید موجود در آن (سافرانال، کروسین، کروستین، و دی‌متیل

کروستین) است. هر یک از این عوامل، ویژگی آنتی‌اکسیدانی منحصر به فردی دارند؛ با این حال، اثر سینرژیسم آن‌ها پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی به زعفران می‌دهد (۳۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که زعفران و ویتامین E می‌تواند پارامترهای اسپرمی را بهبود بخشد، ساختار کروماتین اسپرم را محافظت نماید و حساسیت DNA به دناتوراسیون پس از قرار گرفتن در معرض محلول اسید دترجنت را کاهش دهد.

مطالعات زیادی اثرات آنتی‌اکسیدانی زعفران را نشان داده‌اند. از جمله حسین‌زاده و همکاران نشان دادند که کاربرد داخل صفاقی عصاره‌ی زعفران و کاروتنوئیدهای سازنده‌ی آن (سافرانال و کروسین) در رت موجب بهبود رفتارهای جنسی مثل افزایش دفعات ارکشن، افزایش دفعات مقاربت، انزال سریع‌تر و ... می‌شود (۳۵). به علاوه، مشخص شده است که استفاده از ۵۰ mg زعفران ۳ بار در هفته به مدت ۳ ماه، به طور معنی‌داری مورفولوژی طبیعی و تحرک اسپرم انسان را بهبود می‌بخشد، اما بر تعداد اسپرم بی‌تأثیر است (۱۴).

همچنین Dominguez-Rebolledo و همکاران نشان دادند که مصرف کروسین به خصوص ۱ mM تحرک را در اسپرم‌های گوزن قرمز که از انجماد خارج شده است، بهبود می‌بخشد؛ اما بر لیپید پراکسیداسیون بی‌تأثیر است (۳۹). به نظر می‌رسد این خصوصیات آنتی‌اکسیدانی زعفران است که این اثرات را ایجاد می‌کند.

در مقابل، در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده است که در مقایسه با گروه دارونما، در نمونه‌های الیگو آستنو تراتوزو اسپرمیای با علت ناشناخته، استفاده از زعفران (۶۰ mg/day) اثر مثبتی بر پارامترهای اسپرم (تعداد، مورفولوژی و تحرک اسپرم‌ها) ندارد. همچنین در مقایسه با گروه شاهد، زعفران بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این افراد نیز تأثیر قابل توجهی ندارد (۴۰). این اختلاف در نتایج ممکن است به دلیل استفاده از دوزهای متفاوت باشد. همچنین نوع جمعیت مورد آزمایش (در برخی موارد افراد سالم و در سایر مطالعات افراد نابارور) نیز می‌تواند عاملی در ایجاد نتایج متفاوت باشد.

در مورد ویتامین E نیز گزارش شده است که تجویز آن به میزان ۳۰۰ mg در بیماران مبتلا به آستنواسپرمی باعث افزایش قابل توجهی در تحرک اسپرم می‌شود (۳۴). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده است که درمان با آنتی‌اکسیدان با دوز ۶۰۰ mg N–استیل سیستئین (NAC یا N-acetyl cysteine) همراه با ویتامین و مواد معدنی باعث افزایش قابل توجهی در تعداد اسپرم بیماران مبتلا به الیگواسپرمی می‌شود (۴۱). همچنین مصرف خوراکی ویتامین E (۴۰۰ mg) و سلنیوم (۲۲۵ mg) باعث افزایش قابل توجهی در تحرک و تعداد اسپرم مردان نابارور می‌شود (۴۲).

علاوه بر این، مؤمنی و همکاران ویتامین E را به تنهایی و همراه با p-NP (Para-nonylphenol) به عنوان اکسیدان در رت تجویز کردند. آن‌ها گزارش کردند که ویتامین E تعداد اسپرم‌های زنده را در گروه‌های ویتامین E و P-NP همراه با ویتامین E نسبت به گروه شاهد بهبود می بخشد. همچنین تعداد اسپرم و تحرک آن در گروه P-NP همراه با ویتامین E در مقایسه با گروه P-NP بهبود یافت (۴۳).

زعفران دارای اثرات حفاظت از DNA نیز هست. در مطالعه‌ای دیگر Premkumar و همکاران دوزهای متفاوت زعفران (mg/kg ۲۰، ۴۰ و ۸۰) را همراه با داروهای آنتی‌تومور در موش سوری به کار بردند و مشاهده نمودند که آسیب DNA کاهش می‌یابد (۴۴). به علاوه، حسین‌زاده و همکاران نشان دادند که استفاده از mg/kg ۴۰ و ۸۰ و یا mg/kg ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ کروسین ۴۵ دقیقه قبل از استفاده از متیل متان سولفات می‌تواند موجب کاهش آسیب DNA در کبد، کلیه، ریه و طحال شود (۴۵).

ویتامین E نیز با اثر آنتی‌اکسیدان بسیار قوی خود قادر است کروماتین را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت نماید. مطابق با نتایج مطالعه‌ی، Greco و همکاران نشان داد که استفاده از g/day ۱ در روز ویتامین‌های C و E موجب کاهش آسیب DNA می‌شود، اما هیچ اثری بر پارامترهای اسپرمی ندارد (۴۶). همچنین Tunc و همکاران گزارش کردند که استفاده از Menevit (حاوی آنتی‌اکسیدان‌های لیکوپن، ویتامین‌های C و E، روی، سلنیوم، فولات و عصاره‌ی سیر) به مدت ۳ ماه هیچ اثری بر پارامترهای اسپرمی ندارد؛ اما موجب حفاظت از کروماتین و بهبود بسته‌بندی کروماتین می‌شود (۴۷). از طرفی، Menezo و همکاران دریافتند که استفاده از ویتامین‌های C و E (۴۰۰ mg)، روی و سلنیوم باعث کاهش میزان فراگمنتاسیون DNA می‌شود و از طرفی، موجب تأثیر ناخواسته و ایجاد عدم تراکم (Decondensation) در هسته‌ی اسپرم می‌گردد که شاید به علت تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها به ویژه ویتامین C بر روی پل‌های دی‌سولفید در پروتامین است (۴۸).

با وجود نتایج حاضل از پژوهش حاضر، Piomboni و همکاران گزارش کردند که استفاده از بتا گلوکان، Papaya، لاکتوفرین و ویتامین‌های C و E تأثیری بر آسیب DNA ندارد؛ هر چند درصد تحرک پیش رونده و مورفولوژی طبیعی را بهبود می‌بخشد (۴۹).

نتایج به دست آمده در این مطالعه، تأیید کننده‌ی اثر حفاظتی زعفران و ویتامین E از کروماتین در مقابل اسید دناتوراسیون است. همچنین نتایج این بررسی نشان از قدرت بالای زعفران و ویتامین E در بهبود پارامترهای اسپرمی دارد. صرف نظر از قیمت به نسبت بالای زعفران، این گیاه دارویی، بومی کشور ایران است و دارای خصوصیات درمانی بسیاری است و جا دارد با تحقیقات بیشتر اثرات مفید درمانی آن بیش از پیش نمایان گردد. با توجه به تغییر سبک زندگی، آلودگی‌های محیطی و رژیم‌های غذایی ناسالم که نتیجه‌ی آن‌ها مواجهه‌ی بیشتر با اکسیدان‌ها است، مصرف غذاها و مکمل‌های گیاهی و سالم مثل زعفران و ویتامین E می‌تواند ضامن حفظ سلامتی باشد؛ هر چند تحقیقات وسیع‌تری در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات سرکار خانم آموزگار مسؤول آزمایشگاه بافت‌شناسی و همچنین سرکار خانم علی اکبری مسؤول آزمایشگاه کشت سلولی که در زمینه‌ی انجام پژوهش حاضر همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. Hum Reprod 1998; 13(6): 1422-4.
2. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol 2005; 3: 28.
3. Giudice LC. Infertility and the environment: the medical context. Semin Reprod Med 2006; 24(3): 129-33.
4. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. Genome Biol 2007; 8(9): 227.
5. Sadeghi MR, Lakpour N, Heidari-Vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Hossaini JH, et al. Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. Rom J Morphol Embryol 2011; 52(2): 645-51.
6. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. Drug Metab Rev 2006; 38(1-2): 171-96.
7. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. J Androl 2008; 29(5): 488-98.
8. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 2001; 18(4): 219-25.
9. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. Fertil Steril 1996; 66(4): 634-9.
10. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 1994; 344(8924): 721-4.
11. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int 2010; 2010.
12. Abdullaev, F. Biological properties and medicinal use of Saffron (Crocus sativus l.). Acta Hort (ISHS) 2007; 739: 339-45.
13. Khayatnouri M, Safavi SE, Safarmashaei S, Babazadeh D, Mikailpourardabili B. The effect of Saffron orally administration on spermatogenesis index in rat. Advances in Environmental Biology 2011; 5(7): 1514-21.
14. Heidary M, Vahhabi S, Reza NJ, Delfan B, Birjandi M, Kaviani H, et al. Effect of saffron on semen parameters of infertile men. Urol J 2008; 5(4): 255-9.
15. Vega SG, Guzman P, Garcia L, Espinosa J, Cortinas de NC. Sperm shape abnormality and urine mutagenicity in mice treated with niclosamide. Mutat Res 1988; 204(2): 269-76.
16. Linder RE, Klinefelter GR, Strader LF, Narotsky MG, Suarez JD, Roberts NL, et al. Dibromoacetic acid affects reproductive competence and sperm quality in the male rat. Fundam Appl Toxicol 1995; 28(1): 9-17.
17. Jasko DJ. Evaluation of stallion semen. Vet Clin North Am Equine Pract 1992; 8(1): 129-48.
18. Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. Reprod Toxicol 1992; 6(6): 491-505.
19. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Aguero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. Theriogenology 1999; 51(4): 721-7.
20. Amann R, Graham J. Spermatozoal function. In: McKinnon A, Voss JL, editors. Equine reproduction. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1993. p. 715- 45.
21. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool 1999; 284(6): 696-704.
22. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72(11): 4425-9.
23. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. J Androl 1995; 16(1): 80-7.
24. Bochenek M, Smorag Z, Pilch J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. Theriogenology 2001; 56(4): 557-67.
25. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13(3): 703-8.
26. Rybar R, Faldikova L, Faldyna M, Machatkova M, Rubes J. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. Veterinarni Medicina 2004; 49(1): 1-8.
27. Mahi CA, Yanagimachi R. Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. J Reprod Fertil 1975; 44(2): 293-6.
28. Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PrB, Sakin F, Atessahin A, Kulaksiz R, et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small

Ruminant Research 2010; 89(1): 24-30.
29. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol 2008; 59(1): 2-11.
30. Sigman M, Jarow JP. Male infertility. In: Wein AJ, editor. Campbell-Walsh urology. 9th ed. Philadelphia, PA: Sanders Elsevier; 2007. p. 609-53.
31. Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Shayesteh M, Tavalaee M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. Andrologia 2010; 42(1): 13-9.
32. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reprod Biomed Online 2005; 11(2): 198-205.
33. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122(4): 497-506.
34. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. J Androl 1996; 17(5): 530-7.
35. Hosseinzadeh H, Ziaee T, Sadeghi A. The effect of saffron, Crocus sativus stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. Phytomedicine 2008; 15(6-7): 491-5.
36. Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. Pesticide Biochemistry and Physiology 2007; 87(2): 115-22.
37. Bansal A, Bilaspuri G. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. Animal Science Papers and Reports 2009; 27(1): 5-14.
38. Kumar V, Bhat Z, Kumar D, Khan N, Chashoo I, Shah M. Pharmacological profile of crocus sativus-a comprehe sive review. Pharmacologyonline 2011; 3: 799-811.
39. Dominguez-Rebolledo AE, Fernandez-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramon M, Carmona M, et al. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. Reprod Fertil Dev 2010; 22(5): 856-70.
40. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of saffron (Crocus sativus Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Phytother Res 2011; 25(4): 508-16.
41. Paradiso GG, Gravina GL, Angelozzi G, Sacchetti A, Innominato PF, Pace G, et al. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? World J Urol 2008; 26(1): 97-102.
42. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Arch Androl 2003; 49(2): 83-94.
43. Momeni HR, Soleimani Mehranjani M, Abnosi MH, Mahmoodi M. Effects of vitamin E on sperm parameters and reproductive hormones in developing rats treated with para-nonylphenol. Iran J Reprod Med 2009; 7(3): 111-6.
44. Premkumar K, Thirunavukkarasu C, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effect of saffron (Crocus sativus L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. Hum Exp Toxicol 2006; 25(2): 79-84.
45. Hosseinzadeh H, Abootorabi A, Sadeghnia HR. Protective effect of Crocus sativus stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs. DNA Cell Biol 2008; 27(12): 657-64.
46. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. J Androl 2005; 26(3): 349-53.
47. Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. Reprod Biomed Online 2009; 18(6): 761-8.
48. Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. Reprod Biomed Online 2007; 14(4): 418-21.
49. Piomboni P, Gambera L, Serafini F, Campanella G, Morgante G, De Leo V. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. Asian J Androl 2008; 10(2): 201-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 26.04.2014
Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014
Accepted: 07.07.2014

Optimizing Acridine Orange Staining for Assessment of Protective Effects of Saffron and Vitamin E on Rat Sperm DNA Structure

Shahnaz Razavi PhD[1], Sayyed Ahmad Vaez MSc[2], Mohammad Mardani PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: In recent decades, relation between reactive oxygen species (ROS) concentration and semen quality was noted. Traditionally, saffron has been not only considered as a food additive but also as a medicinal herb, which has good antioxidant properties. Vitamin E is considered as a endogenous and supplementary antioxidant which can protects the cell. The aim of this study was to evaluate the protection influence of saffron and vitamin E on sperm DNA against acid.

Methods: Thirty adult male Wistar rats randomly divided into 3 equal groups of saffron, vitamin E and controlwhich received saffron (100 mg/kg/day), vitamin E (100 mg/kg/day) and distilled water (0.5 cc/day), respectively. After 60 days, cauda epididymis dissected and sperm were used for analysis of sperm chromatin susceptibility to acid denaturation via acridine orange (AO) staining. Acridine orange staining was carried out with or without acid detergent incubation.

Findings: Both, saffron and vitamin E, decreased sperm DNA damage against acid ($P < 0.001$).

Conclusion: Saffron and vitamin E protect DNA against denaturation, probably because of their powerful antioxidant properties.

Keywords: Antioxidants, Saffron, Vitamin E, DNA damage

Citation: Razavi Sh, Vaez SA, Mardani M. **Optimizing Acridine Orange Staining for Assessment of Protective Effects of Saffron and Vitamin E on Rat Sperm DNA Structure.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): 1061-72

1- Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD student, Department of Tissue Engineering, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/هفته دوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۱۸

بررسی جهش در اگزون‌های ۸ و ۳ ژن SLC۳A۱ و اگزون‌های ۴ و ۱۰ ژن SLC ۷A۹ در بیماران مبتلا به سیتینوری در ایران

لیلا کولیوند[۱]، دکتر مهرداد محمدی[۲]، دکتر رسول صالحی[۳]، بهروز عزت‌پور[۴]، دکتر مجید خیراللهی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سیستینوری یکی از اولین اختلالات متابولیسمی شناخته شده می‌باشد که با افزایش ترشح سیستین، آرژنین، لیزین و اورنیتین به درون ادرار مشخص می‌شود. دو ژن در ارتباط با بیماری شناخته شده است: ژن SLC۳A۱ (۲p۱۶/۳) کد کننده‌ی زیر واحد سنگین rBAT، متعلق به ترانسپورتر کلیوی $b^{0,+}$ و ژن SLC۷A۹ (۱۹q۱۳/۱) که زیر واحد سبک ترانسپورتر را کدگذاری می‌کند. بیماران با دو جهش در ژن SLC۳A۱ به عنوان نوع A، بیماران با دو جهش در ژن SLC۷A۹ به عنوان نوع B شناخته می‌شوند. بیماران با سیستینوری نوع AB دارای یک جهش در ژن SLC۳A۱ و یک جهش در ژن SLC۷A۹ می‌باشند. با وجود توزیع اختصاصی جهش در جمعیت‌های خاص، مطالعات محدودی در خاور میانه صورت گرفته است. این مطالعه نتایج بررسی ژنتیکی در بیماران مبتلا به سیستینوری در ایران را ارایه می‌دهد.

روش‌ها: ۳۰ بیمار تحت عمل جراحی برداشت سنگ کلیه، توسط پزشک متخصص اورولوژیست با تشخیص سنگ‌های سیستینی انتخاب شدند. بیماران برای تعیین جهش، با استفاده از روش‌های ARMS (Amplification refractory mutation system) و PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در مجموع چند واریانت اعم از بد معنی، پلی‌مورفیسم، هم‌معنی و واریانت اینترونی یافت شدند؛ اما جهش‌های شایع مطالعات دیگر، در بیماران این مطالعه یافت نشدند.

نتیجه‌گیری: شاید بتوان این مطالعه را تأییدی بر اثر نژادی روی توزیع جهش‌ها در بیماری سیستینوری دانست. امید آن می‌رود که این مطالعه بتواند در درک ژنتیک مولکولی بیماران سیستینوری در ایران روشنگر باشد.

واژگان کلیدی: جهش، سیستینوری، ایران

ارجاع: کولیوند لیلا، محمدی مهرداد، صالحی رسول، عزت‌پور بهروز، خیراللهی مجید. **بررسی جهش در اگزون‌های ۸ و ۳ ژن SLC۳A۱ و اگزون‌های ۴ و ۱۰ ژن SLC ۷A۹ در بیماران مبتلا به سیتینوری در ایران.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ۱۰۸۰-۱۰۷۳

---

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۱۴۳۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه اورولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات پیوند کلیه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
۵- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خیراللهی
Email: mkheirollahi@med.mui.ac.ir

مقدمه

سیتینوری یکی از اولین اختلالات متابولیسم مادرزادی است که توسط گارود توصیف شد (۱). بیماری با افزایش ترشح سیستین و آمینو اسیدهای دی‌بازیک در ادرار شناخته می‌شود. بیماری به علت انتقال مختل شده‌ی این آمینو اسیدها از طریق سلول‌های اپیتلیال مجرای پروکسیمال کلیوی و دستگاه گوارش ایجاد می‌شود (۳-۲). شیوع جهانی سیستینوری ۱ در ۷۰۰۰ نفر برآورد شده است، در حالی که این میزان دامنه‌ای از ۱ در ۲۵۰۰ نفر در یهودیان لیبیایی تا ۱ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در بیماران سوئدی را دارا می‌باشد (۶-۴).

در مطالعه‌ای، شیوع سیستینوری در ایران ۶-۲ درصد ذکر شده است (۷). تاکنون دو ژن در ارتباط با این بیماری شناخته شده است: SLC۳A۱ (CSNU۱ ,MIM # ۱۰۴۶۱۴) و SLCVA۹ (CSNU۳ ,MIM # ۶۰۴۱۴۴).

ژن SLC۳A۱ که روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲ (۲p۱۶/۳) واقع شده است، زیر واحد بزرگ (rBAT) ترانسپورتر $b^{0,+}$ را کد می‌کند. ژن SLCVA۹ روی بازوی بلند کروموزوم ۱۹ (۱۹q۱۳/۱) قرار گرفته است و کد کننده‌ی زیر واحد کوچک ترانسپورتر می‌باشد (۹-۸). ابتدا SLC۳A۱ در سال ۱۹۹۴ شناسایی شد (۱۱-۱۰). سپس SLCVA۹ توسط آنالیز پیوستگی نقشه‌یابی شد (۱۳-۱۲). در سال ۲۰۰۲، سیستینوریا بر اساس ژنتیک مولکولی به نوع A (جهش در ژن SLC۳A۱)، نوع B (جهش در ژن SLCVA۹) و نوع AB (یک جهش در SLC۳A۱ و یک جهش در SLCVA۹) طبقه‌بندی شد (۱۵-۱۴).

تاکنون بیش از ۱۰۰ جهش در ژن SLC۳A۱ و نزدیک به ۱۰۰ جهش در ژن SLCVA۹ یافت شده است (۱۴، ۱۲). این مطالعه بررسی تعیین جهش‌های شایع در بیماران سیتینوری در کشور ایران می‌باشد.

روش‌ها

نمونه‌گیری: در این مطالعه از ۱۵۰۰ بیمار که در بیمارستان الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تحت عمل جراحی سنگ کلیه قرار گرفته بودند، ۳۰ بیمار بر اساس جنس سنگ (سیستینی) انتخاب شدند. همه‌ی بیماران دارای تاریخچه‌ی افزایش ترشح ادراری سیستین و آمینو اسیدهای دی‌بازیک بودند و سنگ‌سازی (مکرر) از نوع سیستین داشتند. پس از اخذ رضایت‌نامه، از تمام بیماران نمونه‌گیری خون انجام شد. استخراج DNA از لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران، توسط روش‌های استاندارد مطابق با روش کیت (Biogenet kit, Korea) انجام شد.

چهار مورد از شایع‌ترین جهش‌های یافت شده در مطالعات قبلی شامل T۲۱۶M، M۴۶۷T (SLC۳A۱) و G,۱۰۵R R۳۳۳W (SLCVA۹) در بیماران مورد بررسی قرار گرفتند (۱۹-۱۶، ۱۲). به این منظور، پرایمرهای مشتق از اینترون با استفاده از داده‌های بیوانفورماتیکی تهیه شدند (جدول ۱). محصولات واکنش با استفاده از کیت BigDye terminator kit و آنالایزر ژنتیکی ۳۷۳۰ Biosystems® مورد آنالیز قرار گرفت.

آنالیز PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)

دو جهش شناخته شده‌ی G۱۰۵R (اگزون ۴) و R۳۳۳W (اگزون ۱۰) واقع در ژن SLCVA۹ با

استفاده از آنزیم‌های محدودگر ApaI و NciI به ترتیب، مورد بررسی قرار گرفتند که هر دو جهش محل برش این آنزیم‌ها را تخریب می‌کنند. این روش با توالی‌یابی تعدادی از محصولات PCR تأیید شد.

PCR-ARMS (Polymerase chain reaction-Amplification refractory mutation system)

دو جهش رایج دیگر شامل M۴۶۷T (اگزون ۸) و T۲۱۶M (اگزون ۳) که در ژن SLC۳A۱ وجود دارند، با این روش مورد مطالعه قرار گرفتند. پرایمرهای موتانت برای هر دو جهش دارای دو نوکلئوتید ناسازگار در هفت باز اول سر ´۳ با توالی طبیعی بودند. نتایج با توالی‌یابی مستقیم تعدادی از محصولات مورد تأیید قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۲۵ µl شامل ۱۵۰ ng DNA ژنومیک، ۲/۵ µl بافر ۱۰X، ۰/۲۵ Taq پلیمراز، ۲۰۰ µmol/l dNTP (Deoxyribonucleotide) و ۴۰۰ nmol/l پرایمر انجام شد.

پروفایل دمایی برای ۳۵ سیکل واکنش با دناتوراسیون ابتدایی ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه آغاز شد و با ۳۵ سیکل در ۹۴ °C به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در ۶۲/۵-۵۵/۵ (دمای مناسب برای هر جفت پرایمر تعیین شد) به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

یافته‌ها

از آن جایی که چند مورد از محصولات PCR به منظور تأیید روش‌های RFLP و ARMS مورد توالی‌یابی قرار گرفتند، در مجموع چهار واریانت در ژن SLC۳A۹ یافت شد که شامل p.G۱۰۵R (اگزون ۴) رایج‌ترین جهش پاتوژن گزارش شده در ژن SLC۷A۹ (۱۷، ۸)، دو پلی‌مورفیسم p.C۱۳۷C (۱۴) و c.۴۷۸ + ۱۰T > C (اگزون ۴) (۱۴) و در نهایت، واریانت p.V۱۴۲A (اگزون ۴) (۲۰) می‌باشند (جدول ۲). از چهار جهش نقطه‌ای مورد مطالعه در بیماران، جهش‌های T۲۱۶M، M۴۶۷T و R۳۳۳W با وجود این که از رایج‌ترین جهش‌های یافت شده در سطح جهانی می‌باشند، در هیچ کدام از بیماران پیدا نشد؛ اما G۱۰۵R در دو بیمار در حالت هتروزیگوت مشخص شد.

بحث

سیستینوری به عنوان یکی از بیماری‌های ارثی به علت نقص در بازجذب کلیوی سیستین و آمینو اسیدهای دی‌بازیک اتفاق می‌افتد. در تحقیق حاضر، از ۱۵۰۰ بیمارکه به منظور برداشت سنگ کلیه در

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش ARMS و RFLP

ژن	اگزون	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	روش
SLC۳A۱	۳	ATGAGGTTTGAGAGAAGCAC	RN:GAAACCAAATATGTTTATCACTCG RM:GAAACCAAATATGTTTATCACTCA RS:ATCTGCCTTTTACCCCTTTG	ARMS Sequence
	۸	ACCCTTTTCTTGCTCATCAG	RN:AGGGAGTGTGAAAAGAAGCA RM: GGGAGTGTGAAAAGATGCG RS: ATAAGCTCTCAGACCACCAA	ARMS Sequence
SLC۷A۹	۴	CCCTTCCTCTCTGTGTTCCAG	GTCTTTTCTGACCCCTGCCC	RFLP
	۱۰	TCTCAGTGCGTTTAACCTCCTC	GCATCTGGGTCATTTGGAAGC	RFLP

RN: پرایمر برگشت طبیعی، RM: پرایمر برگشت جهش یافته، RS: پرایمر برگشت برای توالی‌یابی

ARMS: Amplification refractory mutation system; RFLP: Restriction fragment length polymorphism

جدول ۲. جهش‌های یافت شده در ژن‌های SLC۳A۱ و SLCvA۹ و فراوانی آللی

ژن	اگزون/ اینترون	تغییر نوکلئوتیدی	تغییر آمینو اسید	نوع تغییر	فراوانی آللی
SLC۳A۱	۸	c.۱۴۰۰T/C	M۴۶۷T	بد معنی	۱ از ۶۰
	۳	c.۶۴۷C/T	T۲۱۶M	بد معنی	۱ از ۶۰
SLCvA۹	۴	c.۴۲۵T/C	V۱۴۲A	بد معنی	۳ از ۶۰
	۴	c.۴۹۸G/A	G۱۰۵R	بد معنی	۲ از ۶۰
	۴	c.۴۷۸ + ۱۰T/C		واریانت اینترونی	۳ از ۶۰
	۴	c.۴۱۱T/C	C۱۳۷C	پلی‌مورفیسم	۳ از ۶۰
	۱۰	c.۱۱۸۲C/T	R۳۳۳W	بد معنی	۱ از ۶۰

بیمارستان الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهانتحت عمل جراحی قرار گرفتند، ۳۰ بیمار با سنگ‌های سیستینی توسط پزشک اورولوژیست انتخاب شدند. بیماران برای چهار مورد جهش شایع ژنتیکی در نواحی کد کننده‌ی ژن‌های SLC۳A۱ و SLCvA۹ بررسی شدند. در مجموع، چهار واریانت ژنومیک در ژن SLCvA۹ مشخص شد. این موارد شامل یک واریانت اینترونی، دو جهش بد معنی، یک جهش هم معنی در ژن می‌باشند.

فراوان‌ترین جهش یافت شده در ژن SLCvA۹ مربوط به G۱۰۵R بود (۲۱، ۱۹-۱۶، ۸). این جهش بعد از اولین لوپ داخل سلولی (IL۱) قرار دارد (۲۲) و افزایش شدید ترشح سیستین در هتروزیگوت‌های این واریانت را باعث می‌شود (۱۷) و در بیماران سیستینوری کشورهای اروپایی از جمله آلمان (۲۳، ۲۱، ۱۸)، ایتالیا (۲۴-۲۳، ۲۱)، چک‌اسلواکی (۹)، یونان (۲۵) و ... دیده شده است؛ اما در چین (۲۶)، ژاپن (۲۰) و آمریکا (۸) یافت نشده است. V۱۴۲A جهش بد معنی گزارش شده در کشورهایی مثل ژاپن (۲۰)، پرتغال (۱۴)، سوئد (۲۷)، یونان (۲۸، ۲۵)، کانادا و آلمان (۱۸) در بیماران مطالعه‌ی حاضر نیز دیده شد. V۱۴۲A در اگزون چهار ژن SLCvA۹ در لوپ خارج سلولی ۲ EL پروتئین $b^{0,+}$ AT قرار دارد (۲۰). از آن جایی که این جهش در افراد طبیعی بدون بروز سیستینوری دیده شده است (۲۰)، کشمکش‌هایی در خصوص بیماری‌زایی این واریانت وجود دارد (۱۴).

یکی از پلی‌مورفیسم‌های یافت شده در بیماران C۱۳۷C (c.۴۱۱T > C) می‌باشد که در بیماران سیستینوری کشورهایی مانند پرتغال (۱۴)، یونان (۲۵) و سوئد (۲۷) گزارش شده است. امروزه مطالعات نشان دهنده‌ی وجود جهش‌های خاموشی می‌باشد که بر خلاف نامشان، عواقب بسیار مخربی مانند تخریب نواحی تنظیمی یا اختلال در عمل پیرایش را ایجاد می‌کنند (۳۰-۲۹، ۱۴).

R۳۳۳W جهش رایج در اگزون ۱۰ ژن SLCvA۹ می‌باشد (۳۱، ۲۲، ۱۷، ۱۲) که در بیماران این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. این جایگاه در خانواده‌ی ترانسپورترهای آمینو اسیدی هترو دایمریک در انسان بسیار حفاظت شده است (۲۰). این جهش در مطالعات انجام شده در آلمان (۳۲، ۲۳، ۱۸، ۱۶)، چک اسلواکی (۹)، یونان (۳۳، ۲۵)، ژاپن (۲۰) و ... گزارش شده است، اما در بیماران مطالعه‌ی کنونی دیده نشد.

جهش M۴۶۷T به عنوان رایج‌ترین تغییر در ژن SLC۳A۱، اولین بار در یک بیمار اسپانیایی شناخته شد (۱۰). این جهش در آلمان (۲۱، ۱۸، ۱۶)، سوئد (۳۴)، چک اسلواکی (۹)، ترکیه (۴)، اسپانیا (۳۶–۳۵) و آمریکا (۳۷) گزارش شده است. با این وجود، این جهش در هیچ یک از بیماران مطالعه‌ی حاضر همانند بیماران ژاپنی مشخص نشد (۳۸).

تغییر T۲۱۶M به عنوان دیگر جهش شایع که در بیماران مورد بررسی قرار گرفت، اولین بار در یک بیمار مصری–ایتالیایی (۳۹) یافت شد. این جهش رایج‌ترین جهش در یونان (۴۰، ۳۳، ۱۶)، ترکیه (۱۶)، آلمان (۱۸) و دیگر کشورها ذکر شده است. این جهش نیز در مطالعه‌ی حاضر پیدا نشد. علاوه بر این، واریانت اینترونی c.۴۷۸ + ۱۰T > C (اگزون ۴) (۱۴) در ژن SLCVA۹ از جمله واریانت‌های یافت شده بود.

به طور خلاصه، در این مطالعه چهار واریانت ژنتیکی یافت شد. از چهار جهش رایج در سطح جهانی، در این مطالعه فقط G۱۰۵R در دو آلل یافت شد. با توجه به این که نتایج ژنتیک مولکولی ممکن است بر پیش‌آگهی و سیر درمان بیماری مؤثر باشد (۱۸)، امید می‌رود این مطالعه در روشن شدن ژنتیک مولکولی بیماران ایرانی کمک کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استادان ارجمند دانشکده ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و تمام بیمارانی که در این طرح ما را یاری رساندند، تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Garrod AE. Inborn errors of metabolism (lectures I–IV). Lancet 1908; 2: 214–20.
2. Palacin M, Goodyear P, Nunes V, Gasparini P. Cystinuria. In: Scriver C, Baudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.
3. Palacin M, Borsani G, Sebastio G. The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. Curr Opin Genet Dev 2001; 11(3): 328-35.
4. Tanzer F, Ozgur A, Bardakci F. Type I cystinuria and its genetic basis in a population of Turkish school children. Int J Urol 2007; 14(10): 914-7.
5. Saravakos P, Kokkinou V, Giannatos E. Cystinuria: current diagnosis and management. Urology 2014; 83(4): 693-9.
6. Knoll T, Zollner A, Wendt-Nordahl G, Michel MS, Alken P. Cystinuria in childhood and adolescence: recommendations for diagnosis, treatment, and follow-up. Pediatr Nephrol 2005; 20(1): 19-24.
7. Akhavan sepahi M, Sharifian M, Shajari A, Heidary A. Clinical manifestations and etiology of renal and urethra stone in children less than 14 years old referring to Fatemi-e-Sahamieh pediatric hospital in Qom, 2007-2008. J Arak Univ Med Sci 2009; 12(3): 1-7. [In Persian].
8. Feliubadalo L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V, et al. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. Nat Genet 1999; 23(1): 52-7.
9. Skopkova Z, Hrabincova E, Stastna S, Kozak L, Adam T. Molecular genetic analysis of SLC3A1 and SLC7A9 genes in Czech and Slovak cystinuric patients. Ann Hum Genet 2005; 69(Pt 5): 501-7.
10. Calonge MJ, Gasparini P, Chillaron J, Chillon M, Gallucci M, Rousaud F, et al. Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. Nat Genet 1994; 6(4): 420-5.
11. Pras E, Raben N, Golomb E, Arber N, Aksentijevich I, Schapiro JM, et al. Mutations in the SLC3A1 transporter gene in cystinuria. Am J Hum Genet 1995; 56(6): 1297-303.
12. Eggermann T, Venghaus A, Zerres K. Cystinuria: an inborn cause of urolithiasis. Orphanet J Rare Dis 2012; 7: 19.
13. Wartenfeld R, Golomb E, Katz G, Bale SJ, Goldman B, Pras M, et al. Molecular analysis of

cystinuria in Libyan Jews: exclusion of the SLC3A1 gene and mapping of a new locus on 19q. Am J Hum Genet 1997; 60(3): 617-24.
14. Barbosa M, Lopes A, Mota C, Martins E, Oliveira J, Alves S, et al. Clinical, biochemical and molecular characterization of cystinuria in a cohort of 12 patients. Clin Genet 2012; 81(1): 47-55.
15. Dello SL, Pras E, Pontesilli C, Beccia E, Ricci-Barbini V, de SL, et al. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria patients and carriers: a need for a new classification. J Am Soc Nephrol 2002; 13(10): 2547-53.
16. Schmidt C, Vester U, Hesse A, Lahme S, Lang F, Zerres K, et al. The population-specific distribution and frequencies of genomic variants in the SLC3A1 and SLC7A9 genes and their application in molecular genetic testing of cystinuria. Urol Res 2004; 32(2): 75-8.
17. Font MA, Feliubadalo L, Estivill X, Nunes V, Golomb E, Kreiss Y, et al. Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. Hum Mol Genet 2001; 10(4): 305-16.
18. Eggermann T, Spengler S, Wirth J, Lahme S. Molecular genetic testing in cystinuria. Int J Human Genet 2011; 11(1): 41-4.
19. Di PM, Louizou E, Fischetti L, Dedoussis GV, Stanziale P, Michelakakis H, et al. Twenty-four novel mutations identified in a cohort of 85 patients by direct sequencing of the SLC3A1 and SLC7A9 cystinuria genes. Genet Test 2008; 12(3): 351-5.
20. Shigeta Y, Kanai Y, Chairoungdua A, Ahmed N, Sakamoto S, Matsuo H, et al. A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese cystinuria cases affecting the C-terminus of the transporter. Kidney Int 2006; 69(7): 1198-206.
21. Botzenhart E, Vester U, Schmidt C, Hesse A, Halber M, Wagner C, et al. Cystinuria in children: distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. Kidney Int 2002; 62(4): 1136-42.
22. Chillaron J, Font-Llitjos M, Fort J, Zorzano A, Goldfarb DS, Nunes V, et al. Pathophysiology and treatment of cystinuria. Nat Rev Nephrol 2010; 6(7): 424-34.
23. Schmidt C, Albers A, Tomiuk J, Eggermann K, Wagner C, Capasso G, et al. Analysis of the genes SLC7A9 and SLC3A1 in unclassified cystinurics: mutation detection rates and association between variants in SLC7A9 and the disease. Clin Nephrol 2002; 57(5): 342-8.
24. Bisceglia L, Fischetti L, Bonis PD, Palumbo O, Augello B, Stanziale P, et al. Large rearrangements detected by MLPA, point mutations, and survey of the frequency of mutations within the SLC3A1 and SLC7A9 genes in a cohort of 172 cystinuric Italian patients. Mol Genet Metab 2010; 99(1): 42-52.
25. Chatzikyriakidou A, Sofikitis N, Georgiou I. Identification of novel cystinuria mutations and polymorphisms in SLC3A1 and SLC7A9 genes: absence of SLC7A10 gene mutations in cystinuric patients. Genet Test 2005; 9(3): 175-84.
26. Yuen YP, Lam CW, Lai CK, Tong SF, Li PS, Tam S, et al. Heterogeneous mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes in Chinese patients with cystinuria. Kidney Int 2006; 69(1): 123-8.
27. Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Denneberg T, Soderkvist P. Mutation analysis of SLC7A9 in cystinuria patients in Sweden. Genet Test 2003; 7(1): 13-20.
28. Chatzikyriakidou A, Sofikitis N, Giannakis D, Tsambalas S, Georgiou I. 466 Six novel polymorphic variants in SLC3A1 and SLC7A9 genes: New approaches to the study of cystinuria. European Urology Supplements 2004; 3(2): 119.
29. Raponi M, Baralle D. Alternative splicing: good and bad effects of translationally silent substitutions. FEBS J 2010; 277(4): 836-40.
30. Pagani F, Raponi M, Baralle FE. Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(18): 6368-72.
31. Font-Llitjos M, Jimenez-Vidal M, Bisceglia L, Di PM, de SL, Rousaud F, et al. New insights into cystinuria: 40 new mutations, genotype-phenotype correlation, and digenic inheritance causing partial phenotype. J Med Genet 2005; 42(1): 58-68.
32. Schmidt C, Tomiuk J, Botzenhart E, Vester U, Halber M, Hesse A, et al. Genetic variations of the SLC7A9 gene: allele distribution of 13 polymorphic sites in German cystinuria patients and controls. Clin Nephrol 2003; 59(5): 353-9.
33. Chatzikyriakidou A, Louizou E, Dedousis GV, Bisceglia L, Michelakakis H, Georgiou I. An overview of SLC3A1 and SLC7A9 mutations in Greek cystinuria patients. Mol Genet Metab 2008; 95(3): 192-3.
34. Harnevik L, Fjellstedt E, Molbaek A, Tiselius HG, Denneberg T, Soderkvist P. Identification of 12 novel mutations in the SLC3A1 gene in Swedish cystinuria patients. Hum Mutat 2001; 18(6): 516-25.
35. Guillen M, Corella D, Cabello ML, Gonzalez JI, Sabater A, Chaves JF, et al. Identification of novel SLC3A1 gene mutations in Spanish cystinuria families and association with clinical phenotypes. Clin Genet 2005; 67(3): 240-51.
36. Gasparini P, Calonge MJ, Bisceglia L, Purroy J, Dianzani I, Notarangelo A, et al. Molecular

genetics of cystinuria: identification of four new mutations and seven polymorphisms, and evidence for genetic heterogeneity. Am J Hum Genet 1995; 57(4): 781-8.

37. Endsley JK, Phillips JA, III, Hruska KA, Denneberg T, Carlson J, George AL, Jr. Genomic organization of a human cystine transporter gene (SLC3A1) and identification of novel mutations causing cystinuria. Kidney Int 1997; 51(6): 1893-9.

38. Egoshi KI, Akakura K, Kodama T, Ito H. Identification of five novel SLC3A1 (rBAT) gene mutations in Japanese cystinuria. Kidney Int 2000; 57(1): 25-32.

39. Bisceglia L, Calonge MJ, Dello SL, Rizzoni G, de SL, Gallucci M, et al. Molecular analysis of the cystinuria disease gene: identification of four new mutations, one large deletion, and one polymorphism. Hum Genet 1996; 98(4): 447-51.

40. Albers A, Lahme S, Wagner C, Kaiser P, Zerres K, Capasso G, et al. Mutations in the SLC3A1 gene in cystinuric patients: frequencies and identification of a novel mutation. Genet Test 1999; 3(2): 227-31.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014

Received: 25.04.2014

Accepted: 09.08.2014

Detection of Mutation in Exons 3 and 8 of SLC3A1 and Exons 4 and 10 of SLC7A9 Genes in Patients with Cystinuria in Iran

Leila Koulivand[1], Mehrdad Mohammadi MD[2], Rasoul Salehi MD[3], Behrouz Ezatpour MSc[4], Majid Kheirollahi PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Cystinuria, one of the first diagnosed inborn errors of metabolism, recognized by hyperexcretion of cystine, lysine, ornithine and arginine into the urine. So far, two genes associated with cystinuria have been identified: SLC3A1 (2p16.3) that encodes the heavy subunit rBAT of the renal $b^{0,+}$ transporter and SLC7A9 (19q13.1), which encodes the light subunit $b^{0,+}$AT. Patients with type A cystinuria have two SLC3A1 mutations, whereas patients with type B have two SLC7A9 mutations and finally patients with type AB have one mutation in each gene. Considering the population-specific distribution of mutations in disease, limited studies on the genetic bases of the cystinuria have been done in Middle East. This research presents the results of mutation analysis on patients with cystinuria in Iran.

Methods: Thirty unrelated patients with cystinuria operated to remove kidney stones were screened by urologist .The patients were analyzed for mutation using amplification refractory mutation system (ARMS) and polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (RFLP-PCR) methods.

Findings: We found some variations including missense mutations, polymorphism and intron variant, but the most frequent mutations, M467T and also T216M and R333W, were not detected in our patients.

Conclusion: Our research may confirm the ethnic distribution of mutations in cystinuria and this study can expand our concept of the genetic basis of cystinuria in Iranian patients.

Keywords: Cystinuria, Mutation, Iran

Citation: Koulivand L, Mohammadi M, Salehi R, Ezatpour B, Kheirollahi M. **Detection of Mutation in Exons 3 and 8 of SLC3A1 and Exons 4 and 10 of SLC7A9 Genes in Patients with Cystinuria in Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): 1073-80

* This paper is derived from a MSc thesis No. 391433 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Urology, School of Medicine AND Urology and Kidney Transplantation Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD Student, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
5- Assistant Professor, Pediatrics Inherited Diseases Research Center 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

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/هفته دوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۱۰

مهار رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی

مرضیه باقری[۱]، دکتر مهدی محمدزاده[۲]، دکتر امیر توکمه‌چی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: این تحقیق به منظور بررسی تاثیر فراکشن‌های پروتئین با وزن مولکولی بالا و پایین به دست آمده از دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش‌ها: ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی و در شرایط بی‌هوازی کشت و پس از شستشو با بافر PBS (Phosphate buffered saline) به کمک دستگاه سونیکاتور، شکسته و جهت جدا کردن دیواره‌ی سلولی از سایر ترکیبات سانتریفیوژ شد. سپس، برای رسوب پروتئین‌های دیواره از اسید تری کلرو استیک ۷۲ درصد و داگزالات سدیم ۱۵ درصد استفاده شد. آن گاه، غلظت‌های ۵۰۰ πg/ml، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ از رسوب پروتئین دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها به طور جداگانه در محیط کشت سلولی تهیه و خواص سلول‌کشی آن‌ها علیه رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در چاهک به روش رنگ‌سنجی MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] سنجیده شد.

یافته‌ها: فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا و وزن مولکولی پایین دیواره‌ی سلولی هر دو پروبیوتیک، قادرند به طور معنی‌داری (P = ۰/۰۴۶) رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ را مهار سازند.

نتیجه‌گیری: استفاده از فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا در هر دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به فراکشن‌های پروتئین با وزن مولکولی پایین دارای اثرات ضد سرطانی بیشتری می‌باشد. همچنین فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازئی نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی دارای درصد سلول‌کشی بیشتری می‌باشد.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، فراکشن پروتئینی، دیواره‌ی سلولی، رده‌ی سرطانی K۵۶۲

ارجاع: باقری مرضیه، محمدزاده مهدی، توکمه‌چی امیر. **مهار رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ۱۰۹۲-۱۰۸۱

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر امیر توکمه‌چی
Email: atokmachi@gmail.com

مقدمه

واژه‌ی پروبیوتیک که ریشه‌ی لاتین دارد، به معنی «برای زندگی» است. سازمان بهداشت جهانی، این اصطلاح را به «ارگانیسم‌های زنده‌ای» اطلاق می‌کند که در صورت مصرف به میزان لازم، اثرات سلامت‌زایی مؤثری برای میزبان خود دارند. این میکروارگانیسم‌ها دارای اثرات تحریکی و تقویتی بر سیستم ایمنی می‌باشند (۱). لاکتوباسیلوس‌ها رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک می‌باشند که خواص ضد توموری این دسته از باکتری‌ها در مطالعات گوناگون نشان داده شده است (۲). لاکتوباسیلوس‌ها گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز منفی و متعلق به خانواده‌ی Lactobacillaceae می‌باشند (۳).

باکتری‌های اسید لاکتیک، مکمل‌های غذایی هستند که اثرات سودمندی در میزبان دارند و به تعادل فلور میکروبی روده کمک می‌کنند (۴). این باکتری‌ها نقش مهمی در تولید و نگهداری بسیاری از محصولات غذایی تخمیر شده دارند (۶-۵). لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها با تولید اسیدهای لاکتیک و استیک، باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالدئید و آمونیاک قادرند رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌های مضر داخل بدن را متوقف نمایند (۷). همچنین این عوامل قادرند پاسخ‌های ایمنی ذاتی شامل ترشح سایتوکین‌ها از لنفوسیت‌ها را تحریک نمایند (۹-۸). لاکتوباسیلوس‌ها دارای فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی، ضد سرطانی، ضد اسهال و ضد حساسیت هستند (۱۰).

لوسمی به معنای خون سفید و عبارت از تکثیر نئوپلاستیک نوع خاصی از این سلول‌های سفید است (گرانولوسیت، مونوسیت، لنفوسیت یا به احتمال کمتر اریتروسیت‌ها و یا مگاکاریوسیت‌ها). اختلال اولیه از سلول‌های بنیادی خون‌ساز منشأ می‌گیرد که ممکن است میلوئید یا لنفوئید باشد. لوسمی میلوئیدی مزمن یک بیماری اکتسابی ناشی از یک نوع ناهنجاری در کروموزوم ۲۲ یاخته‌های مغز استخوان است. لوسمی میلوئیدی مزمن، در مردان بین سنین ۶۰-۴۰ سال شایع‌تر است و افرادی که تحت پرتوهای یونیزه و یا تماس با بنزین و مشتقات آن قرار داشته‌اند، بیشتر در معرض خطر ابتلا به آن هستند (۱۱).

رده‌ی سلول‌های سرطانی K۵۶۲ جزء سلول‌های سرطانی خون با منشأ میلوئیدی است که برای اولین بار از یک خانم ۵۳ ساله‌ی مبتلا به سرطان خون مزمن جدا شد (۱۲). بسیاری از درمان‌های کنونی برای مهار رشد رده سرطانی K۵۶۲ تا حدود قابل توجهی مؤثر می‌باشند، اما دارای اثرات جانبی هستند. شواهد نشان می‌دهند که برخی از پرو تئین‌های با کتریایی و پپتیدهای کوتاه در برابر سلول‌های توموری مختلف در شرایط In-Vitro و In-Vivo مؤثر می‌باشند (۱۳). عصاره‌های سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدا شده از روده‌ی ماهی کپور معمولی در مقایسه با گروه شاهد که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند، دارای فعالیت سلول‌کشی بر رده‌ی سرطان خون لوسمی میلوئیدی مزمن هستند (۱۴).

هدف از این تحقیق، مطالعه‌ی تأثیر فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌ی سلولی به دست آمده از باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدا شده از روده‌ی ماهی کپور بر رشد رده‌ی سرطانی K۵۶۲ در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش‌ها

تهیه‌ی سلول سرطانی و کشت آن

سلول‌های سرطانی K۵۶۲ (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI (Roswell Park memorial institute) (Gibco, England) و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, England)، U/ml ۱۰۰ پنی سیلین و µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین در انکوباتور حاوی ۵ درصد گاز CO_2، در دمای ۳۷ °C، ۹۵ درصد رطوبت و به مدت ۹۲-۴۸ ساعت کشت داده شدند. سلول‌ها پس از رشد (تا حدود ۸۰ درصد سطح فلاسک)، شمارش و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت باکتری‌ها و تهیه‌ی دیواره‌ی سلولی آن‌ها

باکتری‌های مورد مطالعه که توسط عزیزپور از روده‌ی ماهی کپور معمولی جدا شده بودند، از کلکسیون میکروارگانیسم آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه تهیه شدند (۱۵).

جهت تهیه‌ی دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌ها، به طور خلاصه ابتدا هر کدام از باکتری‌ها به صورت جداگانه در ml ۱۰ محیط کشت آبگوشت MRS (Man, Rogosa and Sharpe) (Merck, Germany) به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ °C کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با rpm ۳۵۰۰ و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات M ۰/۱ و pH برابر با ۶/۹ شستشو داده شدند.

رسوب به دست آمده به مدت یک شبانه روز در دمای ۸۰- °C نگهداری شد. سپس باکتری‌ها به روش انجماد و ذوب تجزیه شدند. در مرحله‌ی بعد عمل خرد کردن باکتری‌ها در کنار یخ، توسط دستگاه سونیکاتور (Tomy, Japan) انجام گرفت. در انتها نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ °C با rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل نیز به عنوان دیواره‌ی سلولی جدا گردید.

تهیه‌ی رسوب پروتئین دیواره‌ی سلولی

ابتدا ml ۱ از اسید تری‌کلرو استیک ۷۲ درصد با غلظت M ۰/۱ به ml ۱ از نمونه افزوده شد و پس از مخلوط شدن به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس با افزودن ml ۱ از داگزالات سدیم ۱۵ درصد با غلظت M ۰/۱ به ml ۱ از نمونه، به مدت ۲-۱ ساعت در یخچال گذاشته شد تا پروتئین رسوب کند. در انتها نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C با rpm ۹۳۰۰ سانتریفیوژ شدند (۱۶).

محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل نیز به عنوان پروتئین دیواره‌ی سلولی جدا گردید. سپس رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات M ۰/۱ و pH برابر ۶/۹ شستشو داده شد. غلظت پروتئین‌های موجود در هر کدام از دیواره‌های سلولی با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۱۷).

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS- PAGE)

جهت بررسی وزن پروتئین‌های به دست آمده از دیواره‌های سلولی از الکتروفورز (SDS- PAGE یا Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) عمودی استفاده شد (BioRad, USA). به صورت دو قسمتی، در بالا ژل SDS-PAGE متراکم کننده‌ی ۵ درصد و در پایین ژل جدا کننده‌ی (Running Gel) ۱۵ درصد تهیه شد.

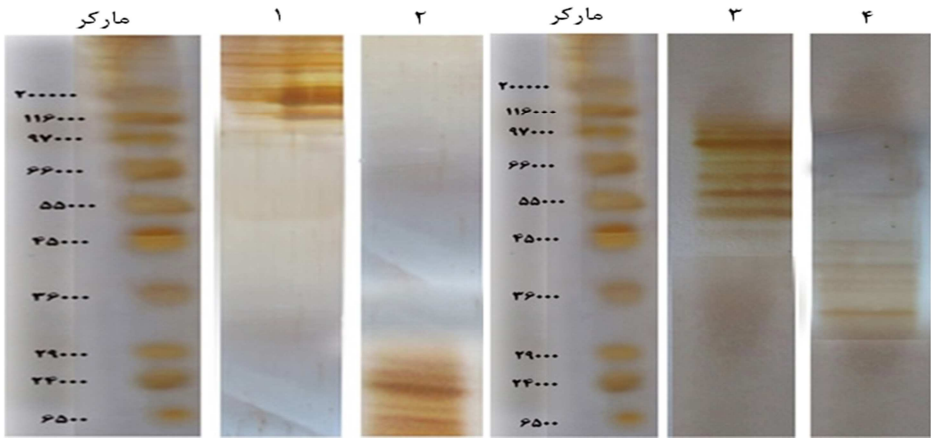
نمونه‌های پروتئینی در حضور نشانگر با اندازه‌ی پروتئینی KD (۲۰۰۰۰۰-۶۵۰۰) در طول ژل تحت جریان الکتریسیته با ولتاژ ۲۵۰ V و به مدت ۳ ساعت حرکت داده و پس از پایان الکتروفورز ژل با رنگ نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد و پس از رنگ‌بری با محلول رنگ‌بر (اتانول و اسید استیک) باندهای پروتئین آشکار گردیدند.

جهت جداسازی فراکشن‌های پروتئین از سفادکس G۱۵۰ و ستون کروماتوگرافی ۲۰ cm^2 × ۶۰ استفاده شد (۱۸). پس از آماده شدن ژل و محاسبه‌ی فضای خالی ژل (Void volume)، نمونه‌های پروتئین عبور داده شد. بر اساس جرم مولکولی، ابتدا پروتئین با وزن مولکولی بالا و بعد پروتئین با وزن مولکولی پایین در طی ۱۸ فراکسیون هر کدام به فاصله‌ی ۲ دقیقه و به مقدار ۲ ml جمع‌آوری شدند.

محتوای پروتئین لوله‌ها از انتهای ستون کروماتوگرافی جمع‌آوری و سپس با اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. لوله‌های فاقد پروتئین حذف شدند. سپس یکی از اولین فراکشن‌های حاوی پروتئین با وزن مولکولی بالا و یک فراکشن حاوی پروتئین با وزن مولکولی پایین از هر دو نمونه‌ی لاکتوباسیلوس انتخاب شد و با آزمایش برادفورد، میزان پروتئین فراکشن‌های انتخاب شده سنجیده شد. سپس جهت بررسی و مشاهده‌ی باندهای موجود در هر فراکشن، نمونه‌ها الکتروفورز شدند (شکل ۱).

تهیه‌ی غلظت‌های مختلف از رسوب پروتئین دیواره‌ی سلولی

در این مطالعه عمل رقیق‌سازی توسط محیط کشت RPMI انجام گرفت و رقت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شرایط استریل تهیه شد. سپس تا زمان استفاده در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند. به طور خلاصه، پس از سانتریفیوژ و شمارش سلول‌های K۵۶۲ به روش تریپان‌بلو، مقدار ۱۰۰ µl (با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMI به همراه ۱۵ درصد FBS یا Fetal bovine serum) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد.



شکل ۱. الکتروفورز فراکشن‌های پروتئینی تهیه شده از دیواره‌ی سلولی پروبیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه. چاهک ۱ و ۲ به ترتیب فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا و پایین لاکتوباسیلوس پاراکازئی و چاهک‌های ۳ و ۴ به ترتیب فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا و پایین لاکتوباسیلوس کازئی.

سپس ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف پروتئین به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک دیگر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به هر کدام ۱۰۰ µl سلول به همراه ۹۰ µl محیط کشت و ۱۰ µl بافر فسفات افزوده شد.

در مرحله‌ی بعد، پلیت‌ها به طور جداگانه به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C و در حضور ۵ درصد گاز CO_2 گرم‌خانه گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، ۲۰ µl از محلول MTT (۳-(۵,۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵,۲- Diphenyltetrazolium Bromide) ۵ mg/ml بافر PBS به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و میکروپلیت به مدت ۴ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیا کرد و آن را به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان در آورد.

در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها، با افزودن ۱۰۰ µl محلول دی‌متیل سولفوکساید خالص به چاهک‌ها و قرار دادن پلیت‌ها در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده در طول موج ۴۹۲ nm با استفاده از دستگاه الایزا خوان ثبت گردید. درصد سلول‌کشی با فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد سلول‌کشی =

[OD شاهد / (OD شاهد – ۱۰۰ OD نمونه)]

بر اساس این فرمول، IC۵۰ (غلظتی که موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی به میزان ۵۰ درصد می‌گردد) پروتئین دیواره‌های سلولی محاسبه گردید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شدند (۱۹).

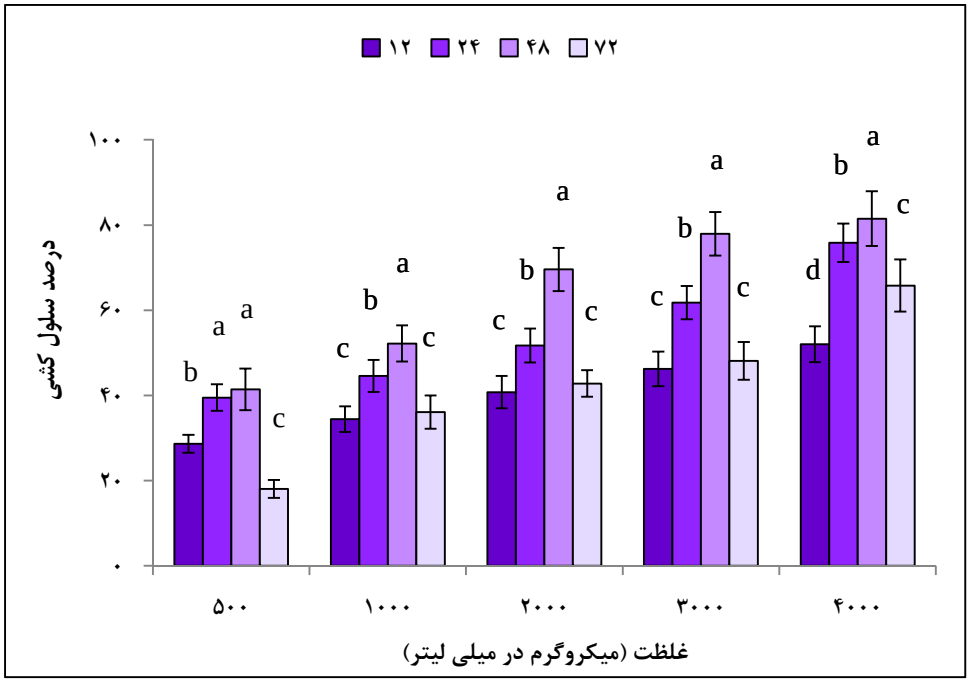
تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون Kruskal–Wallis و نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها، سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < ۰/۰۵۰$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (Office 2010) انجام گرفت.

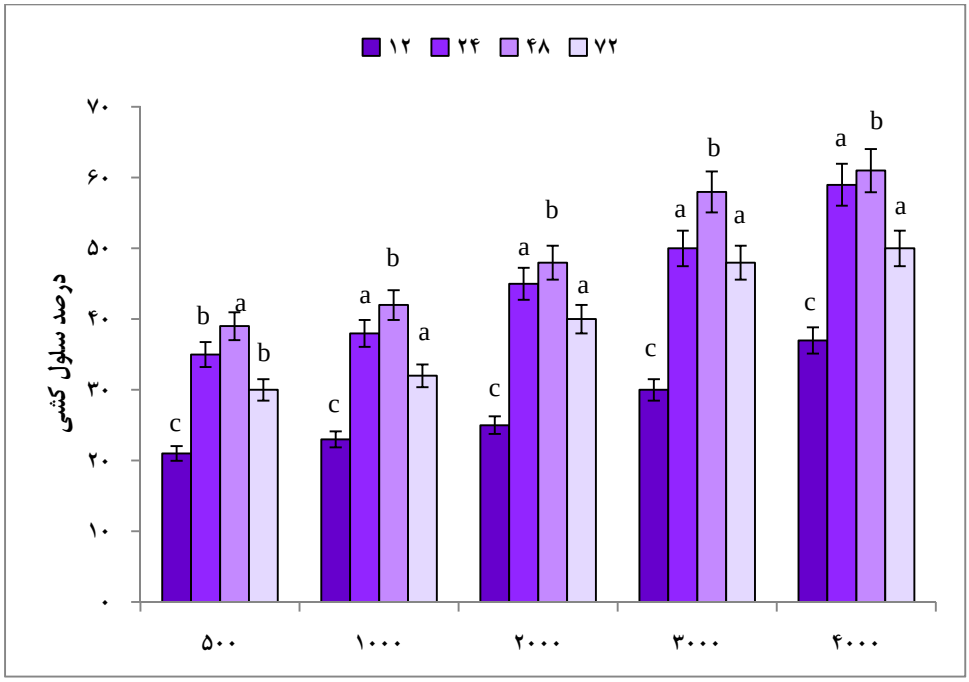
یافته‌ها

نتایج به دست آمده از آزمون MTT نشان داد که فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌های سلولی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی در مقایسه با گروه شاهد دارای فعالیت سلول‌کشی می‌باشند. بر اساس نتایج به دست آمده، اثر مهاری فراکشن‌های پروتئینی دیواره‌های سلولی وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت، مرگ سلول‌های سرطانی نیز افزایش می‌یابد. همچنین فراکشن‌های با وزن مولکولی بالای دیواره‌های سلولی هر دو گونه‌ی لاکتو باسیلوس، درصد سلول‌کشی بیشتری نسبت به فراکشن‌های با وزن مولکولی پایین دارند.

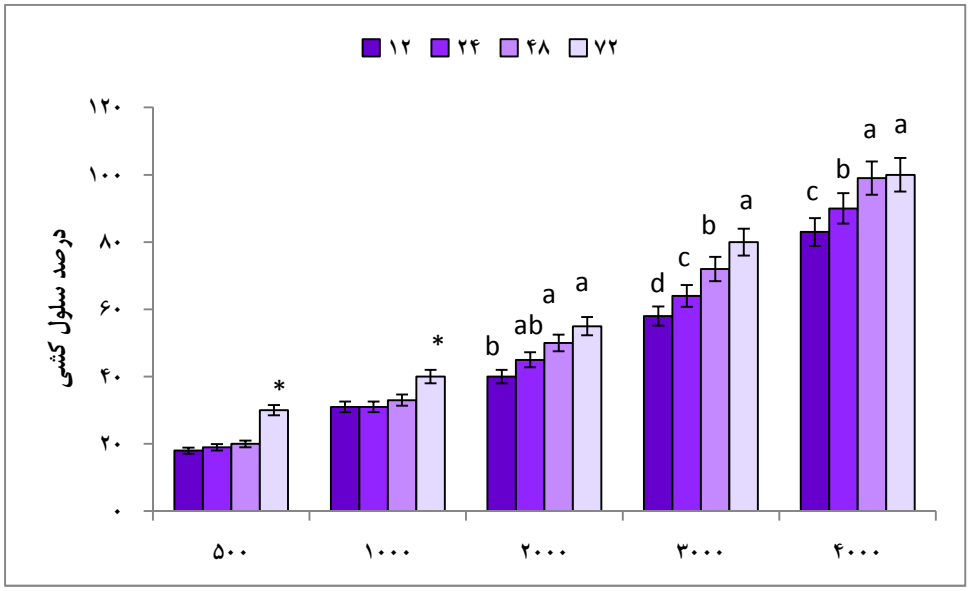
همچنین علاوه بر افزایش غلظت با گذشت زمان در هر دو فراکشن لاکتوباسیلوس کازئی، درصد سلول‌کشی هم بیشتر شد و بهترین زمان برای سلول‌کشی ۷۲ ساعت بود (شکل‌های ۲ و ۳). اما در مورد لاکتوباسیلوس پاراکازئی، بهترین زمان برای سلول‌کشی، ۴۸-۲۴ ساعت در هر دو فراکشن بود و در زمان ۷۲ ساعت کمتر شد (شکل‌های ۴ و ۵).



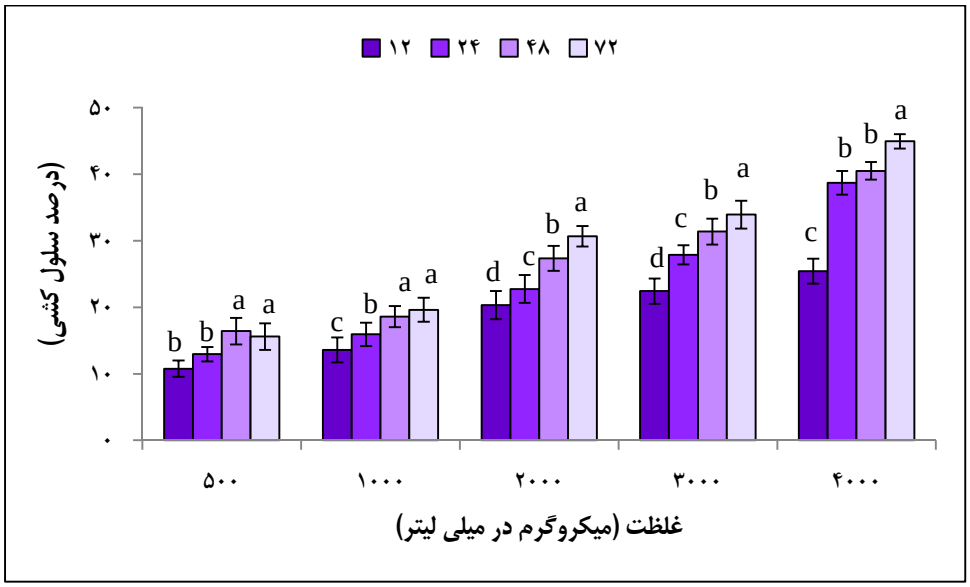
شکل ۲. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالای دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس کازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها، نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد)



شکل ۳. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی پایین دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس کازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد)



شکل ۴. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالای دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس پاراکازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد).



شکل ۵. مقایسه‌ی درصد سلول‌کشی غلظت‌های مختلف فراکشن‌های پروتئینی با وزن مولکولی پایین دیواره‌ی سلولی در لاکتوباسیلوس پاراکازئی در زمان‌های مختلف (حروف متفاوت بالای میله‌ها نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد).

بحث

تأثیر متابولیت‌های حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک در مهار رشد سلول‌های سرطانی ثابت شده است. پروبیوتیک‌ها می‌توانند با اتصال به مواد سرطان‌زا و پیش سرطان‌زا، آن‌ها را مهار و حذف نمایند. همچنین طبق یافته‌های محققین، شیر تخمیر شده‌ی حاوی

باکتری‌های L. acidophilus، B. animalis، B. bifidum، B. Infantis و L. Paracasei رشد رده‌ی سلولی MCF۷ را مهار می‌کند (۲۰).

همچنین Fichera و Giese گزارش کردند که پپتیدوگلیکان جدا شده از دیواره‌ی سلولی Lactobacillus casei قادر است رشد سلول‌های سرطانی انسان و موش را در شرایط آزمایشگاهی مهار نماید (۲۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد، تیمار سلول‌های HT۲۹ (یکی از رده‌های سلول‌های سرطانی کولون) با پلی ساکاریدهای جدا شده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیل ۶۰۶، باعث مهار سلول‌ها می‌شود. این پلی ساکاریدها در اکثر سلول‌ها از طریق القای آپوپتوز سبب مهار رشد می‌شوند (۲۲).

هنوز مکانیزم دقیق عملکرد ضد سرطانی لاکتوباسیلوس‌ها مشخص نیست؛ اما گفته شده است که یکی از پپتیدهای موجود در عصاره‌ی سیتوپلاسمی آن‌ها لاکتوفرین است. این ماده در انتهای N خود دارای توالی خاصی از اسیدهای آمینه است که خاصیت ضد توموری دارند و موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۳).

مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی تأثیر پروتئین‌های دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به عنوان یک عامل مهاری سرطان بر یکی از رده‌های سلولی معروف لوسمی K۵۶۲ صورت گرفت. طبق تحقیقات انجام گرفته توسط سایر محققین، عصاره‌ی سلولی لاکتوباسیلوسها دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشد و می‌توانند سلول‌های سرطانی را به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) از بین ببرند (۱۴). در این مطالعه یافته های حاصل از تأثیر رسوب پروتئینی دیواره‌ی سلولی باکتری‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماهی کپور بر مهار رشد سلول سرطانی نشان داد که رسوب پروتئینی دیواره های سلولی هر دو باکتری توانست رشد سلول های سرطانی را مهار نمایند؛ به طوری که با افزایش غلظت قدرت سلول‌کشی آن‌ها افزایش یافت. از این رو نتایج این تحقیق مخالف یافته‌های کبیری و همکاران می‌باشد (۱۴). دلیل این امر می‌تواند ناشی از این مسأله باشد که در مطالعه‌ی حاضر، رسوب باقی‌مانده به عنوان دیواره‌ی سلولی توسط اتوکلاو استریل شد؛ اما در مطالعات صورت گرفته توسط این محققان، دیواره‌ی سلولی به دست آمده از این باکتری‌ها با فیلتر سرسرنگی µ ۰/۰۲۲ استریل گردید (۱۴).

با توجه به این که ترکیبات ضد سرطانی دیواره‌ی سلولی، به صورت کامل از فیلتر عبور نمی‌نماید، این نتایج تأیید کننده‌ی این مطلب می‌باشد که طبق تحقیقات انجام گرفته توسط سایر محققین، دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوسها دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشد و می‌تواند سلول‌های سرطانی را از بین ببرد. همچنین P۵۳ یک ژن سرکوب کننده‌ی تومور است که به نام نگهبان سلول نیز مشهور است و در انسان بر روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد. فعالیت‌های پروتئین P۵۳ شامل توقف چرخه‌ی سلولی در پاسخ به آسیب DNA و آغاز آپوپتوز در صورت عدم ترمیم DNA می‌باشد. ژن سرکوبگر تومور P۵۳ که به واسطه‌ی جهش‌های نقطه‌ای در بخش بزرگی از تومورهای انسانی غیر فعال شده است، از آپوپتوز جلوگیری می‌نماید و باعث پیشرفت تومور می‌شود. بنابراین P۵۳ به عنوان یک هدف بسیار مناسب برای

روش‌های درمانی به منظور پیشگیری از سرطان در نظر گرفته می‌شود. از این رو جلوگیری از بیان P۵۳ جهش یافته به منظور کاهش تکثیر سلولی، مقاومت شیمیایی و کاهش سرطان‌زایی در رده‌های مختلف سلولی نشان داده شده است (۲۴).

همان‌طور که گفته شد، لوسمی میلوئیدی مزمن (CML یا Chronic myelogenous leukemia) بیماری کلونال سلول‌های بنیادی چند توان است که حاصل جابه‌جایی دو طرفه‌ی کروموزومی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ می‌باشد (۲۵).

این جابه‌جایی کروموزومی باعث به وجود آمدن ژن هیبرید Bcr-abl می‌شود که پروتئین $P۲۱۰^{Bcr-Abr}$ را کد می‌کند و فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین، باعث تکثیر بی‌رویه‌ی این سلول‌ها و نقص در فرایند آپوپتوز می‌گردد (۲۶). از جمله راهکارهای درمانی که تاکنون برای درمان CML به کار گرفته شده است، می‌توان به شیمی درمانی، پیوند مغز استخوان، درمان با اینترفرون آلفا و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد (۲۷).

در سال‌های اخیر، داروی اختصاصی مهار کننده‌ی تیروزین کینازی Bcr-abl به نام ایماتینب مسیلات (Imatinib mesylate) (ST۱۵۷۱ یا Gleevec) و داروهای نسل‌های بعد از آن، جهت درمان پیشنهاد شده است که امروزه به عنوان خط اولیه‌ی درمان CML به کار می‌رود؛ اما وجود مقاومت دارویی مانع اصلی در بهبود این بیماران با روش‌های درمانی پیش‌گفته است (۲۹-۲۸). از این رو، سلول‌های K۵۶۲ به عنوان مدل فاز حاد بیماری CML به دلیل دارا بودن ژن جهش یافته‌ی P۵۳ انتخاب شد. پس از بررسی اثرات آپوپتوزی دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی بر رده‌ی سرطانی K۵۶۲، تأثیر این ترکیبات در میزان بیان پروتئین P۵۳ به روش الایزا ساندویچ سنجیده شد. در این تحقیق پس از اثبات القای آپوپتوز توسط رسوب پروتئینی دیواره‌ی سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی، بیان ژن P۵۳ با اندازه‌گیری میزان پروتئین P۵۳ به روش الایزا سنجیده شد تا تأثیر این ترکیبات بر ژن جهش یافته‌ی P۵۳ در رده‌ی سرطانی K۵۶۲ مشخص گردد.

نتایج نشان داد رسوب پروتئینی دیواره‌ی سلولی لاکتوباسلوس‌های کازیی و پاراکازیی، باعث کاهش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵۰$) سطح پروتئین حاصل از ژن جهش یافته‌ی P۵۳ نسبت به گروه شاهد می‌شوند و میزان سلول‌کشی رسوب پروتئینی دیواره با وزن مولکولی بالا بیشتر از رسوب پروتئینی دیواره با وزن مولکولی پایین است. همچنین طبق نتایج بدست آمده از این بررسی می توان نتیجه گرفت که پروتئین‌های استخراج شده از دیواره‌ی سلولی به عنوان یکی از اجزای مهم دیواره‌ی سلولی هستند که نقش مهمی در کاهش فعالیت سلول‌های سرطانی K۵۶۲ خون دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی دانشکده‌ی علوم دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

References

1. Schrezenmeir J, de VM. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. Am J Clin Nutr 2001; 73(2 Suppl): 361S-4S.
2. de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr 2000; 71(2): 405-11.
3. Willett W. The search for the causes of breast and colon cancer. Nature 1989; 338(6214): 389-94.
4. Hashemi M, Kroczak TJ. Apoptosis and autoimmune disease. Current Medicinal Chemistry 2005; 4(4): 429-37.
5. Schar-Zammaretti P, Dillmann ML, D'Amico N, Affolter M, Ubbink J. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of Lactobacillus acidophilus. Appl Environ Microbiol 2005; 71(12): 8165-73.
6. Juarez Tomas MS, Ocana VS, Wiese B, Nader-Macias ME. Growth and lactic acid production by vaginal Lactobacillus acidophilus CRL 1259, and inhibition of uropathogenic Escherichia coli. J Med Microbiol 2003; 52(Pt 12): 1117-24.
7. Bromberg R, Moreno I, Zaganini CL, Delboni RR, Delboni RR. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Braz J Microbiol 2004; 35(1-2): 137-44.
8. Gill HS, Rutherfurd KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019). Br J Nutr 2000; 83(2): 167-76.
9. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J Clin Nutr 2001; 73(2 Suppl): 451S-5S.
10. Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. Nutr Res Rev 2004; 17(2): 277-84.
11. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. Lancet 2007; 370(9584): 342-50.
12. Ekert H, Jurk IH, Waters KD, Tiedemann K. Prophylactic co-trimoxazole and lactobacilli preparation in neutropenic patients. Med Pediatr Oncol 1980; 8(1): 47-51.
13. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Lett Appl Microbiol 2006; 42(5): 452-8.
14. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirezh N, Nikbakhsh P. Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of Lactobacilli isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. Tehran Univ Med J 2011; 68(12): 691-8. [In Persian].
15. Azizpour K. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) of West Azarbaijn, Iran. Res J Biol Sci 2009; 4(3): 324-6.
16. Sanchez B, Schmitter JM, Urdaci MC. Identification of novel proteins secreted by Lactobacillus rhamnosus GG grown in de Mann-Rogosa-Sharpe broth. Lett Appl Microbiol 2009; 48(5): 618-22.
17. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. The protein protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press; 1996. p. 11-5.
18. Fisher L. Experimental and technique in column of gel filterasion choromatography. In: Fisher L, Editor. Gel filterasion choromatography. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Publication; 1980. p. 81-137.
19. Tsai YT, Cheng PC, Fan CK, Pan TM. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101. Int J Food Microbiol 2008; 128(2): 219-25.
20. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di FG. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. Nutr Cancer 1997; 28(1): 93-9.
21. Fichera GA, Giese G. Non-immunologically-mediated cytotoxicity of Lactobacillus casei and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. Cancer Lett 1994; 85(1): 93-103.
22. Iyer C, Kosters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic Lactobacillus reuteri promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. Cell Microbiol 2008; 10(7): 1442-52.
23. Roy MK, Kuwabara Y, Hara K, Watanabe Y, Tamai Y. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. J Dairy Sci 2002; 85(9): 2065-74.
24. Bossi G, Lapi E, Strano S, Rinaldo C, Blandino G, Sacchi A. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. Oncogene 2006; 25(2): 304-9.
25. Singhal N, Bapsy PP, Babu KG, George J. Chronic myeloid leukemia. J Assoc Physicians India 2004; 52: 410-6.

26. Rosca A, Arion C, Colita A, Nedelcu L, Scirneciu C, Andreescu O, et al. Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution. Bulletin of the Transilvania University of Brasov 2009; 2(51): 97-104.
27. Quintas-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc 2006; 81(7): 973-88.
28. Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. Biologics 2007; 1(4): 433-48.
29. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009; 453-60.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.04.2014
Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014
Accepted: 01.08.2014

In-Vitro Growth Inhibition of K562 Cell Line with Cell Wall Protein Fraction of Lactobacillus Casei and Lactobacillus Paracasei

Marzieh Bagheri[1], Mehdi Mohammadzadeh PhD[2], Amir Tukmechi PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: This study was aimed to evaluate the effect of high and low molecular weight of protein fraction obtained from Lactobacillus casei and paracasei cell wall on K562 cell line.

Methods: Bacteria cultured in special medium and incubated in anaerobic condition and washed with PBS (Phosphate buffered saline) and then, sonicated and centrifuged for cell wall separation. Protein precipitation was conducted with trichloroacetc acid (72%) and sodium deoxalate (15%). Then, different concentrations (500, 1000, 2000, 3000 and 4000 µg/ml) of cell wall proteins were prepared in cell culture medium for each bacteria, separately. In-vitro anticancer properties of both bacteria proteins were assayed in 12, 24, 48 and 72 hours with MTT colorimetric method [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] with 10000 cells per well.

Findings: The high and low molecular weight proteins of both bacteria inhibit the growth of K562 significantly (P = 0.046).

Conclusion: Based on the results, we conclude that high molecular weight of both probiotic bacteria significantly could inhibit the growth of K562 more than the low molecular protein fractions. Also, protein fraction of Lactobacillus paracasei significantly had more anticancer properties than protein fraction of Lactobacillus casei.

Keywords: Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei, Protein fraction, Cell wall, K562

Citation: Bagheri M, Mohammadzadeh M, Tukmechi A. **In-Vitro Growth Inhibition of K562 Cell Line with Cell Wall Protein Fraction of Lactobacillus Casei and Lactobacillus Paracasei.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): 1081-92

1- MSc Student, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
2- Assistant of Professor, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
3- Assistant of Professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Amir Tukmechi PhD, Email: atokmachi@gmail.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/هفته دوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۲۵

ارتباط شاخص توده‌ی بدنی و افزایش وزن مادر با نتایج بارداری

زهرا یزدان پناهی[۱]، صدیقه فروهری[۱]، امیرحسین بابائی[۲]، محبوبه حاجی فقها[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: افزایش وزن دوران بارداری و شاخص توده‌ی بدنی مادر، نقش مهمی در پیامد بارداری دارند. افزایش وزن در دوران بارداری بر اساس شاخص توده‌ی بدنی قبل از بارداری مادران تعیین شده است. این مطالعه به منظور تعیین ارتباط بین شاخص توده‌ی بدنی و افزایش وزن بارداری با نتایج مادری- جنینی انجام شد.

روش‌ها: در این پژوهش ۴۷۶زن باردار سالم با جنین تک قلو وارد مطالعه شدند و بر اساس شاخص توده‌ی بدنی و افزایش وزن در بارداری گروه‌بندی شدند. اطلاعات در مورد سن مادر، وضعیت دموگرافیک، تعداد زایمان، وزن ابتدای حاملگی، اضافه وزن حاملگی، قد مادر، تاریخچه‌ی قبلی زایمان زودرس، تهوع و استفراغ با تکمیل پرسش‌نامه‌ی پزشکی- مامایی جمع‌آوری شد. طول مراحل لیبر (زایمان)، سن حاملگی، روش زایمان، مشخصات نوزادی و خونریزی اولیه بعد از زایمان در فرم ثبت اطلاعات زایمان درج شد. پس از تجزیه و تحلیل آماری، ارتباط بین شاخص توده‌ی بدنی و اضافه وزن در طی حاملگی با پیامدهای مادری و نوزادی تعیین شد.

یافته‌ها: مادران با افزایش وزن طبیعی، نتایج بارداری بهتری داشتند. در زنان کم وزن و یا افزایش وزن کم بارداری، تعداد نوزادان کم وزن بیشتر بود. همچنین زنان دارای اضافه وزن و افزایش وزن زیاد بارداری، با میزان بالاتری از عمل سزارین و خونریزی پس از زایمان مواجه شدند. تفاوت معنی‌داری بین شاخص توده‌ی بدن مادر با القای لیبر، نمایش غیر طبیعی جنین، روش زایمان، وزن نوزاد، تهوع، استفراغ و افزایش وزن در دوران بارداری وجود داشت. زنان با افزایش وزن مناسب در رابطه با وزن، دور سر و دور سینه‌ی نوزادان و روش‌های زایمان و خونریزی پس از زایمان پیامدهای مطلوبی داشتند.

نتیجه‌گیری: ارایه دهندگان مراقبت‌های دوران بارداری باید به منظور جلوگیری از عوارض مرتبط با بارداری و زایمان و حفظ سلامت مادران و نوزادان، زنان دارای شاخص توده‌ی بدنی غیر طبیعی اوایل بارداری و یا افزایش وزن نامناسب بارداری را تحت مراقبت ویژه قرار دهند.

واژگان کلیدی: عوارض مادری- جنینی، شاخص توده‌ی بدنی، افزایش وزن، نتایج بارداری

ارجاع: یزدان پناهی زهرا، فروهری صدیقه، بابائی امیرحسین، حاجی فقها محبوبه. **ارتباط شاخص توده‌ی بدنی و افزایش وزن مادر با نتایج بارداری.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ۱۱۰۲-۱۰۹۳

مقدمه

شاخص توده‌ی بدنی طبیعی و اضافه وزن مناسب در حاملگی برای امنیت، حفاظت و ارتقای سلامتی زنان و نوزادان مهم می‌باشند و می‌توانند پیامدهای مطلوب و سلامتی بیشتری را برای مادر و نوزاد به ارمغان آورند. اضافه وزن در طول حاملگی برای خانم‌هایی که قبل از حاملگی شاخص توده‌ی بدنی (BMI یا Body mass index) طبیعی داشتند، ۱۱/۵-۱۶/. kg/m^2 گزارش شده بود (۴-۱). مؤسسه‌ی پزشکی آمریکا (IOM یا

۱- مربی، گروه مامایی، دانشکده‌ی پرستاری و مامایی حضرت فاطمه (س)، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۲- دانشجوی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محبوبه حاجی فقها
Email: foghaha2000@yahoo.com

Institute of Medicine) در سال ۱۹۹۰ اعلام کرد که یک ارتباط قوی بین اضافه وزن حاملگی و اندازه‌ی نوزاد وجود دارد و محدوده‌های هدف برای اضافه وزن را با توجه به شاخص توده‌ی بدنی حاملگی توصیه کرد. ۱۰ سال بعد از IOM، تعداد زیادی از محققان نه تنها وزن نوزاد، بلکه پیامدهایی نظیر چگونگی لیبر، زایمان و کاهش وزن مادر بعد از زایمان را نیز در ارتباط با اضافه وزن زیاد بارداری گزارش کردند (۲).

همچنین چاقی و اضافه وزن زیاد در حاملگی را با عوارضی از جمله فشار خون بالا، دیابت، پره اکلامپسی، چند قلویی، ماکروزومی، سزارین، پروزانتاسیون غیر طبیعی جنین، خونریزی مامایی، ترومبوفلبیت بعد از زایمان، عفونت مجاری ادراری، لیبر غیر طبیعی، دیستوشی شانه، پارگی شدید پرینه و خفگی جنین همراه دانستند (۸-۵). از طرف دیگر، عوارض مامایی گزارش شده‌ی مربوط به مادران کم وزن (Underweight) نیز عبارت از کم خونی، پارگی زودرس کیسه‌ی آمنیوتیک (PROM یا Premature rupture of membranes)، نمره‌ی Apgar پایین، وزن کم نوزاد، زایمان پره ترم و افزایش مرگ و میر پری‌ناتال می‌باشند (۵). بنابراین با توجه به اهمیت شاخص توده‌ی بدنی مادر و روند افزایش وزن حاملگی و فقدان مطالعات مستند بومی، این پژوهش به منظور بررسی ارتباط شاخص توده‌ی بدنی مادر و افزایش وزن بارداری با پیامدهای مادری- جنینی در بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی شیراز صورت گرفت تا با استفاده از یافته‌های آن گامی در جهت حفظ سلامت مادر و جنین برداشته شود.

روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی بود که توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد تأیید قرار گرفت. جامعه‌ی پژوهش را تمامی زنان باردار مراجعه کننده به درمانگاه بارداری بیمارستان‌های حضرت زینب (س) و حافظ تشکیل دادند و در مجموع، ۴۷۶ زن باردار واجد شرایط پژوهش به طور تصادفی در عرض یک سال انتخاب شدند. محدوده‌ی سنی واحدهای مورد پژوهش ۴۰-۱۸ سال در نظر گرفته شد و باید دارای یک جنین زنده، سالم، بدون آنومالی (ناهنجاری) مادرزادی و مشکلات آمنیوتیکی و جفتی بودند. افراد مبتلا به فشار خون بالا، دیابت، بیماری قلبی- عروقی، مشکلات تیروئید، اختلالات کلیوی و مصرف کنندگان سیگار و مواد مخدر نیز از مطالعه حذف شدند.

اطلاعات در مورد سن مادر، وضعیت دموگرافیک، تعداد زایمان، وزن ابتدای حاملگی و هنگام زایمان، اضافه وزن حاملگی، قد مادر، تاریخچه‌ی قبلی زایمان زودرس، تهوع و استفراغ با تکمیل یک پرسش‌نامه پزشکی- مامایی جمع‌آوری شد. اضافه وزن مادر در حاملگی، از اختلاف وزن مادر در ابتدای بارداری و وزن هنگام زایمان محاسبه گردید و شاخص توده‌ی بدن مادر از تقسیم وزن بر مجذور قد (kg/m^2) تعیین شد. سپس با توجه به دستورالعمل IOM، هر واحد پژوهش بر اساس نمایه‌ی توده‌ی بدن در طبقه‌ی کم وزن (کمتر از ۱۹/۸ kg/m^2)، طبیعی (۱۹/۸-۲۶/۰ kg/m^2)، دارای اضافه وزن (۲۶/۱-۲۹/۰ kg/m^2) و چاق (بالای ۲۹/۰ kg/m^2) قرار گرفت (جدول ۱). جهت اندازه‌گیری وزن مادر و نوزاد از وزنه‌ی استاندارد و به منظور اندازه‌گیری قد

جدول ۱. محدوده‌ی توصیه شده‌ی افزایش وزن برای زنان باردار بر اساس شاخص توده‌ی بدنی قبل از بارداری تک قلویی

محدوده	شاخص توده‌ی بدنی (kg/m^2)	افزایش وزن (kg)
کم وزن	< ۱۹/۸	۱۲/۵-۱۸/۰
طبیعی	۱۹/۸-۲۶/۰	۱۱/۵-۱۶/۰
زیاد	۲۶/۱-۲۹/۰	۷/۰-۱۱/۵
چاق	> ۲۹/۰	۷/۰

مادر و وزن، قد، دور سر، دور سینه و دور بازوی نوزاد از متر استاندارد استفاده شد. قد و وزن نوزاد، دور سینه و بازو، نمره‌ی Apgar دقیقه‌ی اول و پنجم نوزاد، روش زایمان، مدت زمان فازهای لیبر (زایمان)، سن حاملگی و خونریزی اولیه بعد از زایمان نیز در فرم جمع‌آوری اطلاعات زایمانی ثبت گردید.

به منظور یافتن ارتباط شاخص توده‌ی بدنی و اضافه وزن در طی حاملگی با پیامد حاملگی، اطلاعات پس از جمع‌آوری و کدبندی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آمار توصیفی به منظور محاسبه‌ی فراوانی و میانگین به کار برده شد و از آزمون‌های t و One- way ANOVA (One-way analysis of variance) برای مقایسه‌ی میانگین‌ها و از آزمون χ^2 برای ارتباط متغیرهای کیفی استفاده گردید و $P < ۰/۰۵۰$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سن متوسط ۴۷۶ نمونه‌ی پژوهش ۵/۱ ± ۲۴/۸ سال بود. ۲۸/۵ درصد افراد تحصیلات مقطع راهنمایی، ۲۸/۲ درصد افراد مقطع دبیرستان، ۳۲/۴ درصد دیپلم و ۸/۴ درصد تحصیلات دانشگاهی داشتند و ۱/۸ درصد بی‌سواد بودند.

میانگین وزن اوایل حاملگی، اضافه وزن حاملگی، شاخص توده‌ی بدن و سن حاملگی به ترتیب ۱۰/۱۰ ± ۵۷/۳۳ kg، ۴/۰۰ ± ۱۱/۵۰ kg، ۳/۹۰ ± ۲۳/۴۰ kg/m^2 و ۱۱/۴۰ ± ۲۷۵/۵۰ روز بود.

میانگین وزن تولد نوزاد، قد، دور سر، دور سینه و دور بازوی نوزادان به ترتیب ۳۱۲۷/۸ g، ۴۹/۱ cm، ۳۴/۰۵ cm، ۳۲/۲ cm و ۱۰/۲ cm و میانگین فاصله‌ی تولد ۲/۷ سال بود. از نظر تعداد بارداری، ۴۵/۴ درصد این موارد مولتی‌پار (چندزا) و ۵۴/۶ درصد نولی‌پار (شکم اول) بودند.

وزن اوایل حاملگی و شاخص توده‌ی بدن بالا در خانم‌های چندزا، بیشتر از گروه دیگر بود (P = ۰/۰۰۰۱)، اضافه وزن حاملگی در ارتباط با شاخص توده‌ی بدنی سه ماهه‌ی اول حاملگی بود (P = ۰/۰۰۲۰). اختلاف بین شاخص توده‌ی بدنی ابتدای حاملگی با عوامل آنتروپومتریک مادری (P = ۰/۰۰۰۱)، روش زایمان (P = ۰/۰۰۰۹)معنی‌دار بود؛ همچنین بین نمایه توده‌ی بدنی مادر در ابتدای حاملگی با دور سر و سینه، دور بازو، قد و وزن هنگام تولد نوزاد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). اگر چه اختلاف معنی‌داری بین ویار و شاخص توده‌ی بدنی اوایل حاملگی وجود نداشت؛ اما استفراغ شدید در خانم‌های دارای اضافه وزن و چاق، بیشتر از گروه دیگر بود. همچنین هیچ ارتباطی

بین شاخص توده‌ی بدنی با میزان خونریزی پس از زایمان مشاهده نشد، اما میزان زایمان پره ترم، القای لیبر (ایناداکشن) و زایمان سزارین در گروه دارای وزن بالا (Over weight) بیشتر از سایر گروه‌ها بود. لازم به ذکر است که شایع‌ترین علت سزارین در این گروه، عدم تطابق سر جنین با لگن مادر بود.

اضافه وزن ارتباط معنی‌داری با وزن نوزاد (P = ۰/۰۱۰۰)، شاخص توده‌ی بدنی سه ماهه‌ی اول حاملگی (P = ۰/۰۰۰۲)، ویار (P = ۰/۰۰۷۰) و خونریزی پس از زایمان (P = ۰/۰۰۰۱) داشت. با وجود این که ارتباطی بین سزارین یا القای لیبر و اضافه وزن مشاهده نشد، اما میزان نمایش غیر طبیعی، عدم تطابق سر با جنین و القای لیبر در خانم‌های دارای اضافه وزن حاملگی بالاتر از ۱۶ kg بیشتر بود. یک اختلاف بارز بین وزن نوزاد با شاخص توده‌ی بدنی سه ماهه‌ی اول حاملگی، سن حاملگی، قد مادر، زایمان پره ترم قبلی و وزن در انتهای حاملگی نشان داده شد (P = ۰/۰۰۰۱).

اختلاف معنی‌داری بین اضافه وزن و شاخص توده‌ی بدن کمتر از kg/m^2 ۱۹/۸ بر اساس توصیه‌ی مؤسسه‌ی پزشکی با وزن (P = ۰/۰۰۱۰)، قد (P = ۰/۰۰۳۰)، دور سر (P = ۰/۰۰۲۰)، دور سینه (P = ۰/۰۰۱۰)، Apgar دقیقه‌ی اول (P = ۰/۰۵۰۰) و دور بازوی نوزاد (P = ۰/۰۲۰۰) مشاهده شد، اما این ارتباط با متغیر Apgar دقیقه‌ی پنجم نوزاد (P = ۰/۲۰۰۰) وجود نداشت (جدول ۳).

همچنین ارتباط معنی‌داری بین وزن نوزاد (P = ۰/۰۰۲۰)، قد (P = ۰/۰۰۵۰)، دور سر (P = ۰/۰۱۱۰)، دور سینه (P = ۰/۰۰۸۰) و دور بازوی نوزاد (P = ۰/۰۰۲۰) با اضافه وزن دوران بارداری در شاخص توده‌ی بدنی kg/m^2 ۱۹/۸–۲۶/۰ مشاهده شد (جدول ۴).

به علاوه، این ارتباط معنی‌دار در زنان دارای شاخص توده‌ی بدنی kg/m^2 ۲۶/۱–۲۹/۰ با وزن (P = ۰/۰۰۵۴)، قد (P = ۰/۰۰۱۰)، دور سر (P = ۰/۰۰۱۰)، دور سینه (P = ۰/۰۳۵۰) و دور بازوی نوزاد (P = ۰/۰۱۰۰) نیز مشاهده شد (جدول ۵). لازم به ذکر است که ارتباط بین افزایش وزن بارداری با متغیرهای Apgar دقیقه‌های اول و پنجم در دو گروه اخیر، معنی‌دار نبود (P > ۰/۰۵۰۰).

جدول ۲. مقایسه‌ی میانگین بین نمایه‌ی توده‌ی بدنی اوایل حاملگی و شاخص نوزادان

شاخص‌های نوزادی / نمایه‌ی توده‌ی بدنی	وزن (g)	قد (cm)	دور سر (cm)	دور سینه (cm)	دور بازو (cm)	Apgar دقیقه‌ی اول	Apgar دقیقه‌ی پنجم
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار
۱۹/۸ n = ۱۱۸	۳۰۰۰/۸ ± ۴۵۹/۸	۴۸/۸ ± ۱/۸	۳۳/۷ ± ۱/۵	۳۱/۸ ± ۱/۷	۱۰/۱ ± ۰/۷	۸/۴ ± ۱/۶	۹/۸ ± ۰/۷
۱۹/۸–۲۶/۰ n = ۲۷۰	۳۱۵۵/۲ ± ۴۴۵/۶	۴۹/۱ ± ۱/۹	۳۴/۱ ± ۱/۴	۳۲/۲ ± ۱/۷	۱۰/۳ ± ۰/۹	۸/۵ ± ۰/۸	۹/۹ ± ۰/۸
۲۶/۱–۲۹/۰ n = ۶۳	۳۱۳۵/۲ ± ۸۴/۸	۴۹/۱ ± ۲/۱	۳۴/۲ ± ۱/۵	۳۲/۵ ± ۱/۴	۱۰/۲ ± ۰/۸	۸/۴ ± ۰/۱	۹/۹ ± ۰/۵
> ۲۹/۰ n = ۲۵	۳۴۱۲/۴ ± ۵۷۶/۳	۵۰/۳ ± ۲/۱	۳۵/۲ ± ۱/۵	۳۳/۷ ± ۱/۷	۱۰/۶ ± ۰/۸	۸/۴ ± ۰/۸	۹/۹ ± ۰/۳
مقدار P	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۶۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۰	۰/۶۶۸۰	۰/۶۴۱۰

جدول ۳. مقایسه‌ی میانگین بین پارامترهای سلامت نوزادان و شاخص توده‌ی بدنی کمتر از kg/m^2 ۱۹/۸

شاخص‌های نوزادی	وزن (g)	قد (cm)	دور سر (cm)	دور سینه (cm)	دور بازو (cm)	Apgar دقیقه‌ی اول	Apgar دقیقه‌ی پنجم
افزایش وزن	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار
< ۱۲/۵ n = ۶۴	۲۸۴۲/۳ ± ۴۲۴/۹	۴۸/۸ ± ۱/۸	۳۳/۲ ± ۱/۴	۳۱/۸ ± ۱/۷	۱۰/۰ ± ۰/۸	۸/۶ ± ۰/۸	۹/۹ ± ۰/۴
۱۲/۵–۱۸/۰ n = ۴۶	۳۱۹۴/۵ ± ۳۰۵/۸	۴۹/۳ ± ۱/۶	۳۴/۳ ± ۱/۶	۳۲/۴ ± ۱/۷	۱۰/۳ ± ۰/۶	۸/۳ ± ۱/۱	۹/۷ ± ۰/۸
> ۱۸ n = ۸	۳۱۵۵/۷ ± ۶۳۱/۸	۵۰/۱ ± ۱/۷	۳۳/۸ ± ۱/۵	۳۲/۵ ± ۱/۱	۱۰/۳ ± ۰/۶	۷/۶ ± ۱/۹	۹/۳ ± ۰/۶
مقدار P	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۲۰	۰/۰۰۱۰	۰/۰۲۰۰	۰/۰۵۰۰	۰/۲۰۰۰

جدول ۴. مقایسه‌ی میانگین بین پارامترهای سلامت نوزادان و افزایش وزن در شاخص توده‌ی بدنی kg/m^2 ۱۹/۸–۲۶/۰

شاخص‌های نوزادی	وزن (g)	قد (cm)	دور سر (cm)	دور سینه (cm)	دور بازو (cm)	Apgar دقیقه‌ی اول	Apgar دقیقه‌ی پنجم
افزایش وزن	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار
< ۱۱/۶ n = ۱۴۳	۳۰۶۷/۴ ± ۴۱۰/۵	۴۸/۸ ± ۲/۰	۳۳/۸ ± ۱/۴	۳۲/۰ ± ۱/۶	۱۰/۱ ± ۰/۸	۸/۶ ± ۰/۸	۹/۹ ± ۰/۱
۱۱/۶–۱۶/۰ n = ۹۵	۳۲۳۴/۵ ± ۴۱۸/۶	۴۹/۲ ± ۱/۹	۳۴/۲ ± ۱/۵	۳۲/۴ ± ۱/۶	۱۰/۴ ± ۰/۸	۸/۵ ± ۰/۸	۹/۹ ± ۰/۴
> ۱۶/۰ n = ۳۲	۳۳۱۱/۶ ± ۴۶۷/۴	۴۹/۸ ± ۱/۸	۳۴/۵ ± ۱/۷	۳۲/۹ ± ۲/۰	۱۰/۹ ± ۰/۵	۸/۴ ± ۰/۸	۹/۹ ± ۰/۵
مقدار P	۰/۰۰۲۰	۰/۰۰۵۰	۰/۰۱۱۰	۰/۰۰۸۰	۰/۰۰۲۰	۰/۴۱۰۰	۰/۷۹۰۰

جدول ۵. مقایسه‌ی میانگین بین پارامترهای سلامت نوزادان و افزایش وزن در شاخص توده‌ی بدن kg/m^2 ۲۶/۱–۲۹/۰

شاخص‌های نوزادی	وزن (g)	قد (cm)	دور سر (cm)	دور سینه (cm)	دور بازو (cm)	Apgar دقیقه‌ی اول	Apgar دقیقه‌ی پنجم
افزایش وزن	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار
< ۶/۸ n = ۱۶	۲۸۷۱/۳ ± ۴۲۳/۵	۴۸/۸ ± ۲/۱	۳۴/۳ ± ۱/۱	۳۲/۳ ± ۱/۱	۱۰/۱ ± ۰/۷	۸/۶ ± ۰/۶	۹/۹ ± ۰/۱
۶/۸–۱۱/۵ n = ۲۸	۳۱۱۵/۴ ± ۴۶۷/۵	۴۸/۴ ± ۱/۹	۳۳/۶ ± ۱/۵	۳۲/۱ ± ۱/۵	۱۰/۰ ± ۰/۸	۸/۲ ± ۱/۳	۹/۹ ± ۰/۴
> ۱۱/۵ n = ۱۹	۳۳۶۸/۰ ± ۴۵/۶	۵۰/۲۱ ± ۱/۸	۳۴/۹ ± ۱/۲	۳۲/۲ ± ۱/۴	۱۰/۵ ± ۰/۸	۸/۴ ± ۰/۷	۹/۹ ± ۰/۵
مقدار P	۰/۰۰۵۴	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۱۰	۰/۰۳۵۰	۰/۰۱۰۰	۰/۲۰۰۰	۰/۲۰۰۰

بحث

در جمعیتی که اضافه وزن و چاقی در زنان در دوره‌ی باروری شایع و معمول است، احتمال اختلالات هیپرتانسیون حاملگی، دیابت حاملگی، سزارین، اقامت طولانی مادر در بیمارستان، افزایش پذیرش نوزادان در بخش مراقبت‌های ویژه، ناهنجاری‌های زمان تولد و پره مچوریتی وجود دارد. در مطالعه‌ی حاضر، اضافه وزن و چاقی در خانم‌های چندزا شایع‌تر بود که ممکن است با تمایل به اضافه وزن در هر حاملگی ارتباط داشته باشد. مطالعات متعدد گزارش کرده‌اند که دو عامل وزن بالا و دیابت حاملگی، تأثیر زیادی بر پیامدهای مادری و نوزادی دارند (۹). تأثیر اضافه وزن در جمعیت مورد مطالعه‌ی حاضر که فقط خانم‌های باردار بدون ابتلا به دیابت را شامل می‌شد، به اثبات رسید.

برخی تحقیقات نشان داده‌اند که ارتباط بین اضافه وزن و پیامدهای حاملگی می‌تواند تحت تأثیر قومیت قرار گیرد (۱۰)، اما یافته‌های منسجم در جمعیت‌های نژادی گوناگون اثبات کرده‌اند که بدون در نظر گرفتن عامل نژادی، مادرانی که بیشتر یا کمتر از مقدار توصیه شده اضافه وزن داشته‌اند، پیامدهای حاملگی نامناسبی دارند (۹).

از آن جایی که چاقی و وزن بالا به عنوان یک عامل مهم در سلامتی می‌باشد و به دلیل اهمیت آن در پیامدهای بارداری، باید شاخص توده‌ی بدنی قبل از حاملگی یا شاخص توده‌ی بدنی اولیه‌ی مادر در پرونده‌ی پره ناتال ثبت شود. در مطالعاتی که روی خانم‌های باردار با شاخص توده‌ی بدن حاملگی طبیعی انجام شد (۱۱)، این نتیجه به دست آمد که میزان بالای سزارین بیشتر تحت تأثیر شاخص توده‌ی بدنی قبل از حاملگی قرار می‌گیرد تا اضافه وزن در طی حاملگی؛ به عبارت دیگر، اضافه وزن زیاد به طور مستقیم با میزان سزارین ارتباط ندارد و یک عامل مهم در افزایش میزان آن به شمار نمی‌رود. این یافته‌ای است که در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد (۱۳-۱۲).

در پژوهش Tanprasertkul و Somprasit اضافه وزن زیاد تأثیری روی طول لیبر در مراحل اول و دوم لیبر نداشته است (۱۱). Seligman و همکاران اظهار داشتند که اضافه وزن کم دوران حاملگی به خطر بالاتر زایمان پره ترم منجر می‌شود (۱۴) و در مطالعه‌ی حاضر، این ارتباط در گروه زنان با وزن بالا مشاهده شد.

Cedergren در یک مطالعه خانم‌های چاق را با خانم‌های وزن طبیعی مقایسه کرد. وی دریافت که چاقی باعث افزایش خطر پره اکلامپسی، مرده‌زایی حین زایمان، سزارین و زایمان با وسیله، دیستوشی شانه و نوزاد بزرگ برای سن حاملگی می‌شود. نتایج یک مطالعه‌ی دیگر این نتیجه را به اثبات رساند که چاقی قبل از حاملگی و اضافه وزن، باعث افزایش خطر زایمان سزارین و زایمان واژینال دشوار می‌شود (۱۵). نتایج پژوهش حاضر نیز ارتباط چاقی با افزایش سزارین و القای لیبر را ثابت کرد و نیز تحقیقات کشورهای مختلف را تأیید کرد که معتقدند ارتباط معنی‌داری بین اضافه وزن در حاملگی و شاخص توده‌ی بدنی قبل از حاملگی با وزن هنگام تولد نوزاد وجود دارد (۲۰-۱۶، ۱۱). اما بعضی بررسی‌ها ارتباط اضافه وزن را با پیامد حاملگی ضعیف دانسته‌اند (۲۱، ۱۹، ۱۷-۱۶، ۱۱).

یافته‌های تحقیق حاضر، بر این نکته دلالت دارد

که چندین پیامد حاملگی از قبیل قد، دور سر، سینه و بازوی نوزاد، خونریزی بعد از زایمان، روش زایمان، استفراغ شدید و اضافه وزن، یک ارتباط بارز با شاخص توده‌ی بدنی اوایل حاملگی دارند. اما Canavan و Deter پی بردند که نمایه‌ی توده‌ی بدن مادر هیچ تأثیری روی اندازه‌ی نوزاد ندارد (۲۲). چندین پژوهشگر نیز دریافتند که متغیرهایی مانند سن حاملگی و وزن تولد پایین در مادران کم وزن و یا دارای اضافه وزن، اندکی بیشتر از دیگر گروه‌ها است (۱۹-۱۶، ۱۱).

برخی مطالعات نشان دادند که عواقب زیانبار در خانم‌های دارای شاخص توده‌ی بدنی طبیعی قبل از حاملگی و اضافه وزن حاملگی مناسب با توجه به توصیه‌ی IOM کمتر دیده شده است (۱۸-۱۶، ۱۱). از طرف دیگر، نشان داده شده است که خانم‌هایی با شاخص توده‌ی بدنی غیر طبیعی قبل از حاملگی و اضافه وزن غیر طبیعی حاملگی، در معرض افزایش خطر پیامدهای نامناسب پره ناتال از قبیل پره مچوریتی و محدودیت رشد داخل رحمی (IUGR یا Intrauterine growth restriction) قرار دارند (۲۴-۲۳، ۲۱، ۱۹).

فدایی و همکاران پی بردند که در صورت مراقبت‌های مناسب قبل و حین بارداری، عوارض نامطلوب حاملگی به حداقل خواهد رسید (۲۵). با توجه به اهمیت موضوع و در نظر گرفتن یافته‌های این تحقیق، لازم است که استراتژی‌های مداخله‌ای صورت بگیرد و زنانی که تصمیم به باردار شدن دارند، باید در یک محدوده‌ی شاخص توده‌ی بدنی طبیعی قرار بگیرند که جهت تحقق یافتن این مهم، می‌توان برنامه‌های آموزشی و مشاوره‌ای در مورد عوامل مؤثر بر وزن شامل تغذیه، ورزش و تغییر در سبک زندگی را برای مادران واقع در سنین باروری در نظر گرفت (۲۸-۲۶، ۲۳).

به علاوه، لازم است مراقبت‌های دوران بارداری با دقت بیشتری انجام شود و ارایه دهندگان مراقبت‌های پره ناتال، باید مادرانی را که شاخص توده‌ی بدنی غیر طبیعی و اضافه وزن حاملگی نامناسب دارند، در گروه پرخطر و تحت مراقبت خاص قرار دهند تا عوارض مادری و جنینی به حداقل برسد.

حاملگی همراه با اضافه وزن غیر طبیعی مادر باید به عنوان یک عامل خطر در نظر گرفته شود و می‌توان به وسیله‌ی کنترل دقیق وزن در دوران پره ناتال، از عوارض مادری و جنینی آن جلوگیری کرد. مدیران و ارایه دهندگان خدمات سلامت باید تلاش کنند تا تمامی زنان در محدوده‌ی شاخص توده‌ی بدنی طبیعی قرار بگیرند و مادران باردار تشویق شوند که در محدوده‌ی اضافه وزن توصیه شده به وسیله‌ی IOM قرار بگیرند تا هم برای نوزاد آن‌ها و هم برای خودشان پیامد بهتری داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی شرکت کنندگان در مطالعه و عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Lederman SA. Pregnancy weight gain and postpartum loss: avoiding obesity while optimizing the growth and development of the fetus. J Am Med Womens Assoc 2001; 56(2): 53-8.
2. Abrams B, Altman SL, Pickett KE. Pregnancy weight gain: still controversial. Am J Clin Nutr 2000; 71(5 Suppl): 1233S-41S.
3. Winkvist A, Stenlund H, Hakimi M, Nurdiati DS, Dibley MJ. Weight-gain patterns from prepregnancy until delivery among women in Central Java, Indonesia. Am J Clin Nutr 2002; 75(6): 1072-7.
4. Cunningham F, Leveno K, Bloom S, Hauth J, Rouse D, Spong C. Williams Obstetrics. 23rd ed. New York, NY: McGraw-Hill Professional; 2009.
5. Callaway LK, Prins JB, Chang AM, McIntyre HD. The prevalence and impact of overweight and obesity in an Australian obstetric population. Med J Aust 2006; 184(2): 56-9.
6. Parker MG, Ouyang F, Pearson C, Gillman MW, Belfort MB, Hong X, et al. Prepregnancy body mass index and risk of preterm birth: association heterogeneity by preterm subgroups. BMC Pregnancy Childbirth 2014; 14: 153.
7. Blomberg M. Maternal body mass index and risk of obstetric anal sphincter injury. Biomed Res Int 2014; 2014: 395803.
8. Hashima JN, Lai Y, Wapner RJ, Sorokin Y, Dudley DJ, Peaceman A, et al. The effect of maternal body mass index on neonatal outcome in women receiving a single course of antenatal corticosteroids. Am J Obstet Gynecol 2010; 202(3): 263-5.
9. Rudra CB, Frederick IO, Williams MA. Pre-pregnancy body mass index and weight gain during pregnancy in relation to preterm delivery subtypes. Acta Obstet Gynecol Scand 2008; 87(5): 510-7.
10. Shaw GM, Wise PH, Mayo J, Carmichael SL, Ley C, Lyell DJ, et al. Maternal prepregnancy body mass index and risk of spontaneous preterm birth. Paediatr Perinat Epidemiol 2014; 28(4): 302-11.
11. Tanprasertkul C, Somprasit C. Effect of high gestational weight gain on birth weight and cesarean section rate in pregnant women with a normal prepregnant body mass index. J Med Assoc Thai 2004; 87(Suppl 3): S24-S28.
12. Rhodes JC, Schoendorf KC, Parker JD. Contribution of excess weight gain during pregnancy and macrosomia to the cesarean delivery rate, 1990-2000. Pediatrics 2003; 111(5 Pt 2): 1181-5.
13. Kyvernitakis I, Kohler C, Schmidt S, Misselwitz B, Grossmann J, Hadji P, et al. Impact of maternal body mass index on the cesarean delivery rate in Germany from 1990 to 2012. J Perinat Med 2014. [Epub ahead of print].
14. Seligman LC, Duncan BB, Branchtein L, Gaio DS, Mengue SS, Schmidt MI. Obesity and gestational weight gain: cesarean delivery and labor complications. Rev Saude Publica 2006; 40(3): 457-65.
15. Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. Obstet Gynecol 2004; 103(2): 219-24.
16. Ehrenberg HM, Dierker L, Milluzzi C, Mercer BM. Low maternal weight, failure to thrive in pregnancy, and adverse pregnancy outcomes. Am J Obstet Gynecol 2003; 189(6): 1726-30.
17. Schieve LA, Cogswell ME, Scanlon KS, Perry G, Ferre C, Blackmore-Prince C, et al. Prepregnancy body mass index and pregnancy weight gain: associations with preterm delivery. The NMIHS Collaborative Study Group. Obstet Gynecol 2000; 96(2): 194-200.
18. Kruger HS. Maternal anthropometry and pregnancy outcomes: a proposal for the monitoring of pregnancy weight gain in outpatient clinics in South Africa. Curationis 2005; 28(4): 40-9.
19. Yekta Z, Ayatollahi H, Porali R, Farzin A. The effect of pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain on pregnancy outcomes in urban care settings in Urmia-Iran. BMC Pregnancy Childbirth 2006; 6: 15.
20. Goshtasb A, Moghadam L, Alizadeh M, Bakvyy S. The relationship between body mass index before pregnancy and maternal weight gain During pregnancy and birth weight. J Mazandaran Univ Med Sci 2011; 21(84): 81-5. [In Persian].
21. Jahanian Sh, Ziaee S, Kazemnejad A. The relationship between body mass index and weight gain during pregnancy with intrauterine growth retardation. Sci J Hamadan Nurs Midwifery Fac 2009; 17(1-2): 67-72. [In Persian].
22. Canavan TP, Deter RL. The effect of maternal body mass index on fetal growth: Use of individualized growth assessment and two-level linear modeling. J Clin Ultrasound 2014.
23. Nematollahzadeh M, Ziaei S, Kazemnejad A. Relationship between body mass index and preterm delivery before and during pregnancy. Zahedan J Res Med Sci 2010; 12(5): 89-94. [In Persian].
24. Eliasdottir OJ, Harethardottir H, Thornorkelsson

T. The effect of maternal weight on pregnancy outcome. Laeknabladid 2010; 96(11): 691-6. [In Icelandic].

25. Fadaei B, Movahedi M, Akbari M, Ghasemi M, Jalalvand A. Effect of maternal age on pregnancy outcome. J Isfahan Med Sch 2011; 29(145): 855-60. [In Persian].

26. Kominiarek MA. A survey of health behaviors in minority women in pregnancy: the influence of body mass index. Womens Health Issues 2014; 24(3): e291-e295.

27. McGiveron A, Foster S, Pearce J, Taylor MA, McMullen S, Langley-Evans SC. Limiting antenatal weight gain improves maternal health outcomes in severely obese pregnant women: findings of a pragmatic evaluation of a midwife-led intervention. J Hum Nutr Diet 2014. [Epub ahead of print].

28. Shin D, Chung H, Weatherspoon L, Song WO. Validity of prepregnancy weight status estimated from self-reported height and weight. Matern Child Health J 2014; 18(7): 1667-740.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 09.04.2014
Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014
Accepted: 16.07.2014

Relationship of the Maternal Body Mass Index and Gestational Weight Gain with Outcomes of Pregnancy

Zahra Yazdanpanahi MSc[1], Sedigheh Foruhari MSc[1], Amirhossein Babaei[2], Mahboubeh Hajifoghaha MSc[1]

Original Article

Abstract

Background: Gestational weight gain and body mass index (BMI) play important role in the outcomes of pregnancy. Weight gain during pregnancy, based on maternal pre-pregnancy body mass index, is determined. In this study, was evaluated the relationship of body mass index and weight gain of pregnancy with maternal-fetal outcomes.

Methods: 476 healthy pregnant women with singleton fetus were divided based on body mass index and weight gain of pregnancy. Information on maternal age, socio-demographic status, parity, early pregnancy weight, gestational weight gain, maternal height, previous history of preterm delivery, nausea, and vomiting were collected by a medical-midwifery questionnaire. Phases of labor (delivery), gestational age, mode of delivery, neonatal characteristics and postpartum bleeding were recorded in the delivery information form.

Findings: Pregnancy outcomes were better in women with normal weight gain. Women with low weight and low weight gain during pregnancy had more low-birth-weight newborns. Also, women with overweight and gestational weight gain were exposed to higher rates of cesarean delivery and postpartum hemorrhage. Significant differences were found between maternal body mass index with induction of labor, fetal malposition, mode of delivery, birth weight, nausea, vomiting, and weight gain during pregnancy. Women with adequate weight gain had appropriate outcomes in relation to weight, length, head and chest circumference of newborns and methods of delivery and postpartum hemorrhage.

Conclusion: Our findings indicate that women with abnormal body mass index in early pregnancy or inappropriate weight gain during pregnancy should get special care to prevent complications of pregnancy and childbirth and to protect the health of mother and child.

Keywords: Maternal-fetal complications, Body mass index, Weight gain, Pregnancy outcomes

Citation: Yazdanpanahi Z, Foruhari S, Babaei A, Hajifoghaha M. **Relationship of the Maternal Body Mass Index and Gestational Weight Gain with Outcomes of Pregnancy.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): 1093-102

1- Instructor, Department of Midwifery, Hazrat Fatemeh School of Nursing and Midwifery , Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2- Student of Medicine, Student Research Committee, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Corresponding Author: Mahboubeh Hajifoghaha MSc, Email: foghaha2000@yahoo.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۳/هفته دوم شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۶

بررسی خصوصیات اپیدمیولوژیک و میزان بروز بیماری تب مالت طی یک دوره‌ی ۱۴ ساله در شهرستان تیران و کرون، اصفهان

مهدی محمدیان[۱]، عبداله محمدیان هفشجانی[۲]

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: هدف این مطالعه تعیین خصوصیات اپیدمیولوژیک بیماران مبتلا به تب مالت و روند بروز بیماری طی سال‌های ۹۱-۱۳۷۸ در سطح شهرستان تیران و کرون بود.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی مقطعی توصیفی- تحلیلی بود که بر روی کلیه‌ی افراد مبتلا به بیماری تب مالت که در فاصله‌ی سال‌های ۹۱-۱۳۷۸ در شهرستان تیران و کرون توسط بخش خصوصی و دولتی شناسایی شدند و جهت ایشان فرم بررسی بیمار مبتلا به تب مالت تکمیل شده بود، انجام گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده‌های مطالعه، از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۹ استفاده شد. میزان تراکم بروز Density incidence rate بیماری بر اساس کل شخص- سال جمعیت در معرض خطر، در طی دوره‌ی ۱۴ساله محاسبه و ارایه شد.

یافته‌ها: میانگین میزان بروز بیماری در طی این دوره‌ی ۱۴ ساله، ۵۲/۹۶ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بود. میزان بروز در مناطق شهری ۵/۶۷ و در مناطق روستایی، ۵۲/۵۴ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بود. بیشترین میزان بروز بیماری در افرادی که شغل آن‌ها کشاورزی و دامداری بود و کمترین میزان در دانش‌آموزان مشاهده شد. بیشترین میزان بروز بیماری در فصل بهار برابر با ۲۶/۶۹ و کمترین میزان آن در فصل پاییز به میزان ۲/۹۴ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بود.

نتیجه‌گیری: میانگین میزان بروز تب مالت در شهرستان تیران و کرون بیشتر از متوسط استانی و روند بروز آن صعودی است. این بیماری در مناطق روستایی بسیار شایع‌تر از مناطق شهری می‌باشد.

واژگان کلیدی: بروسلوز، بروز، اپیدمیولوژیک، تیران و کرون

ارجاع: محمدیان مهدی، محمدیان هفشجانی عبداله. **بررسی خصوصیات اپیدمیولوژیک و میزان بروز بیماری تب مالت طی یک دوره‌ی ۱۴ ساله.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۳): ۱۱۰۹-۱۱۰۳

مقدمه

بیماری بروسلوز یکی از بیماری‌های زئونوز (مشترک انسان و دام) می‌باشد که از طریق دام آلوده، به انسان انتقال می‌یابد. نام‌های دیگر این بیماری تب مواج و تب مدیترانه‌ای است (۱). این بیماری با کاهش بهره‌وری، سقط و ضعف در دام‌ها موجب افت چشمگیر در سرمایه‌های اقتصادی کشورها می‌شود (۲). بیماری به طور عمده در افراد جوان که از نظر اجتماعی و اقتصادی فعال هستند، در روستاییان و همچنین در مردان بیشتر دیده می‌شود (۱). طبق گزارش سازمانی جهانی بهداشت، در جهان سالیانه حدود ۵۰۰۰۰۰ مورد جدید بیمار مبتلا به تب مالت

۱- کارشناس ارشد، گروه آمار زیستی اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: عبداله محمدیان هفشجانی
Email: a_mohamadii@yahoo.com

شناسایی و گزارش می‌شوند. البته تخمین زده می‌شود که حتی در کشورهای پیشرفته، تنها ۱۰-۴ درصد موارد بروسلوز تشخیص داده می‌شود (۳).

این بیماری در منطقه‌ی جنوب شرقی مدیترانه آندمیک می‌باشد. در ایران نیز با وجود سیستم بهداشتی- درمانی مناسب، این بیماری هنوز به صورت آندمیک حضور دارد. ایران از نظر بروز بیماری بروسلوز در جهان، رتبه‌ی چهارم جهانی و رتبه‌ی اول منطقه‌ی مدیترانه‌ی شرقی را دارد. در طی ۱۸ سال گذشته، به طور متوسط در هر سال، ۲۷۵۰۰ مورد جدید بیماری در کشور گزارش شده است (۴).

یکی از مهم‌ترین پیش‌نیازها، جهت اعمال برنامه‌های مناسب بهداشتی جهت پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی بیماری در هر منطقه، در اختیار داشتن آمار و اطلاعات اپیدمیولوژیک مناسب می‌باشد. از این رو، با توجه به این که این بیماری در کشور در طی سالیان گذشته همواره به صورت آندمیک حضور دارد و به نوعی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در این منطقه (شهرستان تیران و کرون) می‌باشد، این مطالعه جهت بررسی جنبه‌های اپیدمیولوژیک و روند بروز بیماری در طی سالیان اخیر در شهرستان تیران و کرون استان اصفهان انجام شد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی مقطعی توصیفی- تحلیلی بود که بر روی تمامی افراد مبتلا به بیماری تب مالت که در فاصله‌ی سال‌های ۹۱-۱۳۷۸ در شهرستان تیران و کرون توسط بخش خصوصی و دولتی شناسایی شده بودند و جهت ایشان فرم بررسی بیمار مبتلا به تب مالت تکمیل شده بود، انجام گردید. تمامی بیماران تحت مطالعه بر اساس تعریف اپیدمیولوژیک بیماری تب مالت، جزء موارد محتمل و قطعی بودند که این امر منجر به مراجعه به مراکز درمانی جهت پیگیری مداوا و ثبت اطلاعات مربوط به آن‌ها شده بود. اطلاعات مربوط به بیماران مبتلا به بیماری تب مالت، از تمامی مراکز بهداشتی- درمانی دولتی و مطب‌های خصوصی سطح شهرستان در قالب طرح گزارش‌دهی غیر فوری بیماری‌های واگیر به گروه مبارزه با بیماری‌های شهرستان اعلام گردید و فرم بررسی جهت این بیماران در مراکز بهداشتی- درمانی و آزمایشگاه‌های دولتی توسط کاردان و یا کارشناس مبارزه با بیماری‌های مرکز و در مطب‌ها و آزمایشگاه‌های خصوصی توسط کارشناس مبارزه با بیماری‌ها که به صورت ماهیانه از مطب‌های خصوصی بازدید می‌کردند، تکمیل شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های مطالعه از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد.

در ابتدا خصوصیات توصیفی بیماران به صورت درصد اعلام شد. در ادامه، میزان تراکم بروز بیماری Density incidence rate بر اساس کل شخص- سال جمعیت در معرض خطر در طی این دوره‌ی ۱۴ ساله محاسبه و ارایه شد. جهت بررسی روند بروز بیماری، در ابتدا تعداد جمعیت شهرستان جهت هر یک از سال‌های مطالعه از واحد آمار مرکز بهداشت شهرستان تهیه شد و میزان تراکم بروز سالیانه‌ی بیماری بر اساس جمعیت هر سال محاسبه و به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ شخص- سال ارایه گردید.

جهت تعیین و مقایسه‌ی میانگین سنی بیماران از آزمون t استفاده شد.

یافته‌ها

طی سال‌های ۹۱-۱۳۷۸ در مجموع ۵۵۴ مورد جدید بیماری تب مالت به مرکز بهداشت شهرستان گزارش شده بود که ۶۴/۴ درصد (۳۵۷ مورد) از بیماران را مردان و ۳۵/۶ درصد (۱۹۷ مورد) را زنان تشکیل می‌دادند. نسبت جنسی (مرد به زن) ۱/۸۱ بود که این نسبت در گروه‌های مختلف سنی متفاوت بود و دامنه‌ای بین ۶-۰/۷۵ داشت. بیشترین این نسبت در گروه سنی ۸۰-۷۱ سال و کمترین آن در گروه سنی ۶۰-۵۱ سال و ۱۰-۰ سال بود. میانگین سنی بیماران در زمان ابتلا به بیماری ۱۷/۹۴ ± ۳۴/۶۳ سال، در مردان ۱۸/۳۷ ± ۳۳/۳۷ سال و در زنان ۱۶/۹۴ ± ۳۶/۹۰ سال بود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (P = ۰/۱۴۷). در مقایسه‌ی میانگین سنی بیماران شهری و روستایی، مشاهده گردید که میانگین سنی در بیماران شهری برابر با ۱۵/۴۶ ± ۳۳/۲۷ و برای بیماران روستایی برابر با ۱۸/۲۴ ± ۳۴/۸۱ بود که اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار بود (P = ۰/۰۰۸).

میانگین میزان بروز بیماری در طی دوره‌ی ۱۴ ساله‌ی مطالعه، ۵۹/۶ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بود. این میزان در مناطق شهری ۵/۶۷ و در مناطق روستایی ۵۲/۵۴، در زنان خانه‌دار و دامدار ۱۶/۰۰، در افراد کشاورز و دامدار ۱۲/۰۰، در افراد دامدار ۱۰/۱۹، در دانش‌آموزان ۶/۸۳ و در سایر مشاغل ۱۳/۰۰؛ در افراد بی‌سواد ۱۲/۹۰، در افراد دارای تحصیلات ابتدایی ۲۱/۲۰، در افراد دارای تحصیلات سیکل ۱۴/۹۰، در افراد دارای تحصیلات دیپلم ۸/۵۰ و در افراد دارای تحصیلات دانشگاهی ۰/۶۰ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بود.

بیشترین میزان بروز بیماری در دهه‌ی سوم و کمترین میزان آن در دهه‌ی اول زندگی مشاهده شد؛ به گونه‌ای که در دهه‌ی اول زندگی میزان بروز بیماری ۲/۲۰، دهه‌ی دوم ۱۳/۸۷، دهه‌ی سوم ۱۴/۵۰، دهه‌ی چهارم ۶/۹۳، دهه‌ی پنجم ۹/۴۵، دهه‌ی ششم ۵/۱۴، دهه‌ی هفتم ۳/۸۸ و دهه‌ی هشتم زندگی ۲/۲۰ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بود. میزان بروز بیماری در بهار ۲۶/۶۹، در تابستان ۱۷/۶۵، در پاییز ۲/۹۴ و در زمستان ۹/۸۷ بود. بنابراین به طور متوسط بروز بیماری در فصل بهار ۹ برابر، در فصل تابستان ۶ برابر و در فصل زمستان ۳/۳ برابر پاییز بود (جدول ۱).

بحث

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

در مطالعه‌ی حاضر، مردان نسبت بیشتری از بیماران را تشکیل می‌دادند (۶۴/۴ درصد)؛ این یافته با نتایج تعدادی از مطالعات دیگر مشابهت دارد (۶-۵)، اما در مطالعاتی که در کشور عربستان (۷) و

جدول ۱. بروز بیماری تب مالت در شهرستان تیران و کرون طی یک دوره‌ی ۱۴ ساله

روند بروز بیماری بین سال‌های ۹۱-۱۳۷۸				بروز بیماری بر اساس ماه‌های سال		
سال	تعداد جمعیت (نفر)	فراوانی	میزان بروز در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر	ماه‌های سال	فراوانی	میزان بروز در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر
۱۳۷۸	۷۰۴۵۶	۴۶	۶۵/۲۸	فروردین	۶۷	۷/۰۴
۱۳۷۹	۷۰۴۲۵	۳۵	۴۹/۶۹	اردیبهشت	۹۹	۱۰/۴۰
۱۳۸۰	۷۰۰۰۱	۲۱	۲۹/۹۹	خرداد	۸۸	۹/۲۴
۱۳۸۱	۶۹۵۸۰	۴۲	۶۰/۳۶	بهار	۲۵۴	۲۶/۶۹
۱۳۸۲	۶۶۴۸۱	۶۴	۹۶/۲۶	تیر	۷۸	۸/۱۹
۱۳۸۳	۶۶۵۰۲	۷۱	۱۰۶/۷۶	مرداد	۶۰	۶/۳۰
۱۳۸۴	۶۵۸۰۸	۵۱	۷۷/۴۹	شهریور	۳۰	۳/۱۵
۱۳۸۵	۶۶۱۹۱	۵۶	۸۴/۶۰	تابستان	۱۶۸	۱۷/۶۵
۱۳۸۶	۶۶۳۶۷	۴۳	۶۴/۷۹	مهر	۱۲	۱/۲۶
۱۳۸۷	۶۷۱۷۶	۱۳	۱۹/۳۵	آبان	۷	۰/۷۳
۱۳۸۸	۶۷۵۷۹	۱۰	۱۴/۷۴	آذر	۱۹	۱/۹۹
۱۳۸۹	۶۷۸۱۵	۱۶	۲۳/۵۹	پاییز	۳۸	۳/۹۹
۱۳۹۰	۶۸۴۲۵	۳۷	۵۴/۰۷	دی	۳۱	۳/۲۵
۱۳۹۱	۶۸۷۶۸	۴۹	۷۱/۲۵	بهمن	۱۹	۱/۹۹
				اسفند	۴۴	۴/۴۶
کل	-	۵۵۴	۵۹/۶۰	زمستان	۹۴	۹/۸۷

نیز بیمارستان امام خمینی (ره) و سینای تهران (۸) انجام شد، بیماری بروسلوز در زنان بیشتر از مردان بود.

به طور کلی، بیماری بروسلوز یک بیماری شغلی است که در مردان شایع‌تر است. اما با توجه به این که در برخی مناطق زنان هم پا به پای مردان در شغل‌هایی همچون کشاورزی و دامداری مشغول می‌باشند، بیماری بروسلوز حتی به عنوان یک بیماری شغلی، به طور الزامی خاص مردان نمی‌باشد.

در این مطالعه مشاهده شد که بیماری در فصل بهار و تابستان که فصل زایش دام‌ها می‌باشد، شایع‌تر است که با سایر مطالعات در این زمینه مطابقت دارد (۹). می‌توان عنوان کرد که در فصل بهار و تابستان به علت تماس با بقایای آبستنی سقط شده و امثال آن و همچنین استفاده از فراورده‌های لبنی آلوده، این بیماری به نسبت بیشتری در مقایسه با پاییز و زمستان رخ می‌دهد. از این رو مؤثرترین زمان ممکن جهت اجرای برنامه‌های مداخله‌ای و پیشگیری قبل از شروع فصل شیوع بیماری، یعنی طی ماه‌های پایان سال و زمان اصلی جهت پیگیری بیماران باید در فصل بهار و تابستان در نظر گرفته شود.

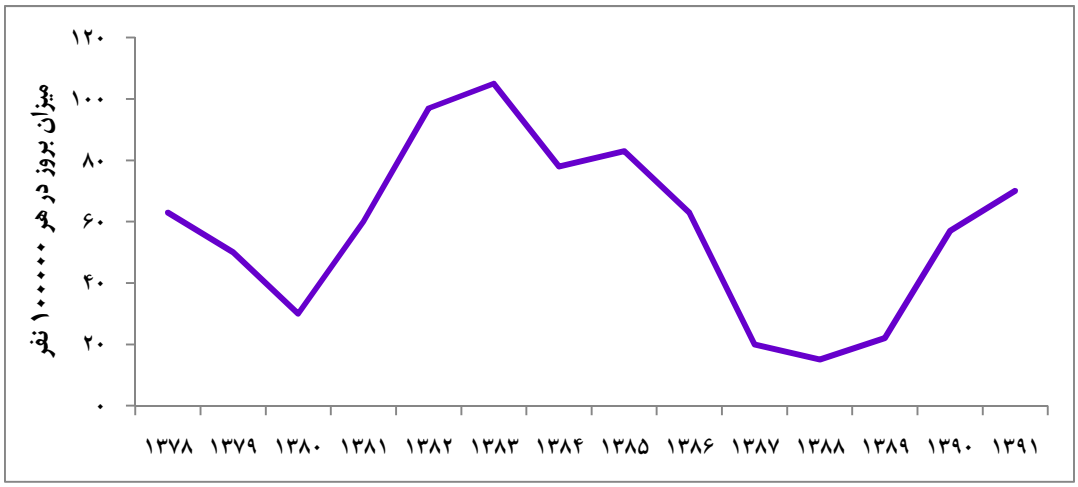
بیماری بیشتر در افراد جوان رخ می‌دهد و میانگین سنی بیماران ۳۴ سال بود که با توجه به فعال بودن این گروه سنی از لحاظ اقتصادی و اجتماعی، اهمیت مبارزه با این بیماری بیشتر مشخص می‌گردد. همچنین ۹۰/۳ درصد از بیماران ساکن مناطق روستایی بودند؛ بیشتر بودن نسبت رخداد بیماری در مناطق روستایی در تعدادی از مطالعات دیگر نیز

مشاهده شده است (۱۰، ۵).

در مطالعه‌ی دیگری در ایران، میانگین بروز سالیانه‌ی بیماری در کشور ۴۳/۲۴ در ۱۰۰۰۰۰ نفر بوده است و روند بروز بیماری نیز نزولی بوده است. میانگین بروز سالیانه‌ی بیماری طی سال‌های ۹۱-۱۳۷۸ در شهرستان تیران و کرون ۵۸/۲۱ در ۱۰۰۰۰۰ نفر بود، که بالاتر از متوسط کشوری می‌باشد. در مطالعه‌ی مصطفوی و آسمند، کشور ایران از نظر میزان بروز بیماری به ۶ دسته از آلودگی بسیار شدید تا آلودگی بسیار کم تقسیم‌بندی شده است که در این بین، استان اصفهان جزء استان‌های با آلودگی بسیار کم (میزان بروز بین ۳۰-۰ در هر ۱۰۰۰۰۰) طبقه‌بندی شده است. به روشنی مشاهده می‌شود که بروز بیماری در شهرستان تیران و کرون بسیار بالاتر از متوسط استانی می‌باشد (۴).

همان‌طور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، در شهرستان تیران و کرون این بیماری دارای روندی مواج می‌باشد و از سال ۱۳۸۸ به بعد دارای روند صعودی است. شاید بتوان یکی از دلایل افزایش مجدد بیماری را -پس از کاهشی که تا سال ۱۳۸۸ در این شهرستان داشته است-، ناشی از بهبود سیستم تشخیص و گزارش‌دهی بیماری و کاهش نسبی در پوشش واکسیناسیون گوسفندها و بزها در شهرستان و یا افزایش تعداد دام‌های موجود در شهرستان در طی چند سال اخیر دانست. تجارب کشورهایی نظیر پرتغال که توانسته‌اند بیماری را ریشه‌کن نمایند، نشان می‌دهد که می‌توان با به کارگیری یک برنامه‌ی منظم آزمایش و کشتار دام‌ها و واکسیناسیون آن‌ها، ضمن کنترل بیماری، آن را حتی ریشه‌کن نیز نمود (۱۰).

سازمان جهانی بهداشت، واکسیناسیون دام‌ها را تنها روش مناسب برای کنترل عفونت بروسلوز دانسته است که باید اولین گام در جهت حذف بیماری در نظر گرفته شود. شایان ذکر است که پیشگیری از ابتلا به این بیماری در انسان، به دو طریق پیشگیری از تماس با دام آلوده و عدم مصرف فراورده‌های دامی آلوده و در صورت امکان، پیشگیری از بروز بیماری دامی از طریق واکسیناسیون دام صورت می‌گیرد. به طور کلی و بر اساس یک معیار جهانی، میزان شیوع بروسلوز در هر کشوری بستگی بسیار نزدیکی با میزان شیوع بیماری در دام‌های آن کشور دارد (۱۱).



شکل ۱. روند بروز بیماری تب مالت در شهرستان تیران و کرون در طی یک دوره ۱۴ ساله

در ایران نیز طی مطالعه‌ای مشاهده شد که بیماری در استان‌های غربی و شمال غربی که دارای تراکم گوسفندی بیشتری هستند، بیشتر گزارش شده است (۴). این موضوع ضرورت کنترل بیماری در جمعیت دامی را نمایان می‌سازد.

نتیجه‌ی پایانی این که میانگین میزان بروز تب مالت در شهرستان تیران و کرون بیشتر از متوسط استانی و کشوری می‌باشد و روند بروز آن نیز صعودی است. این بیماری در مناطق روستایی بسیار شایع‌تر از مناطق شهری می‌باشد. بنابراین اقدامات آموزشی، پیشگیری و درمانی در مناطق روستایی و به خصوص، افراد دارای گروه شغلی دامدار و خانه‌دار دارای الویت بیشتری نسبت به مناطق شهری است. با توجه به حضور بهورزان در خانه‌های بهداشت در مناطق روستایی، می‌توان از خدمات ایشان در برگزاری مداخلات آموزشی استفاده‌ی بیشتری نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت مدیریت و تمامی کارکنان مرکز بهداشت شهرستان تیران و کرون به‌ویژه کارکنان واحد مبارزه با بیماری‌های این شهرستان و همچنین آقای حمید لطف الهی کارشناس واحد مبارزه با بیماری‌ها تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Azizi F, Janghorbani M, Hatami H. Epidemiology and control of common disorders in Iran. Tehran, Iran: Eshtiagh Publication; 2000. p. 32. [In Persian].
2. Smits HL, Kadri SM. Brucellosis in India: a deceptive infectious disease. Indian J Med Res 2005; 122(5): 375-84.
3. Long SS, Pickering LK, Prober CG. Principles and practice of pediatric infectious disease. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences; 2012.
4. Mostafavi E, Asmand M. Trend of brucellosis in Iran from 1991 to 2008. Iran J Epidemiol 2012; 8(1): 94-101. [In Persian].
5. Almasi-Hashiani A, Khodayari M, Eshrati B, Shamsi M. Factors affecting the interval between the onset and diagnosis of brucellosis in Markazi Province, Iran (2010-11). J Arak Univ Med Sci 2012; 14(7): 21-30. [In Persian].
6. Sofian M, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A. Risk factors for human brucellosis in Iran: a case-control study. Int J Infect Dis 2008; 12(2): 157-61.
7. Elbeltagy KE. An epidemiological profile of brucellosis in Tabuk Province, Saudi Arabia. East Mediterr Health J 2001; 7(4-5): 791-8.
8. Haddadi A, Rasoulinejad M, Afhami Sh, Mohraz M. Epidemiological, clinical, para clinical aspects of brucellosis in Imam Khomeini and Sina Hospital of Tehran (1998-2005). J Kermanshah Univ Med Sci 2006; 10(3): 242-51. [In Persian].
9. Tohme A, Hammoud A, el RB, Germanos-Haddad M, Ghayad E. Human brucellosis. Retrospective studies of 63 cases in Lebanon. Presse Med 2001; 30(27): 1339-43. [In French].
10. Farahani Sh, Shah-Mohamadi S, Navidi I, Sofian M. An investigation of the epidemiology of brucellosis in Arak City, Iran, (2001-2010). J Arak Univ Med Sci 2012; 14(7): 49-54. [In Persian].
11. Martins H, Garin-Bastuji B, Lima F, Flor L, Pina FA, Boinas F. Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal-Outcome of a 5-year programme (2002-2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. Prev Vet Med 2009; 90(1-2): 80-9..

Journal of Isfahan Medical School
Received: 05.05.2013
Vol. 32, No. 293, 2nd Week, September 2014
Accepted: 28.07.2013

Epidemiological Characteristics and Incidence Rate of Brucellosis Over A Period of 14 Years in the Tiran-Karvan Township, Isfahan, Iran

Mahdi Mohammadian MSc[1], Abdollah Mohammadian-Hafshejani MSc[2]

Short Communication

Abstract

Background: The purpose of this study was to determine the epidemiological characteristics and incidence rate of brucellosis in the Tiran-Karvan Township in Isfahan province, Iran, during 1999-2012.

Methods: This cross-sectional study was performed on all patients with brucellosis in public and private sectors of the Tiran-Karvan Township from 1999 to 2012, which had completed brucellosis form. The incidence density rate was calculated and reported based on total person-years in study duration.

Findings: The mean incidence density rate in a 14-year period was 52.96 per 100000 person-years. This rate was 5.67 in urban area, and 52.54 in rural area. The highest incidence was in people employed in agriculture and animal husbandry and the least level was for students. Besides, the highest incidence rate was in spring and the least in autumn as 26.69 and 2.44 per 100000 person-years, respectively.

Conclusion: The mean incidence of brucellosis in the Tiran-Karvan was higher than province average and the trend of its incidence was rising. However, the disease is much more common in rural than urban areas.

Keywords: Brucellosis, Incidence, Epidemiologic, Iran

Citation: Mohammadian M, Mohammadian-Hafshejani A. **Epidemiological Characteristics and Incidence Rate of Brucellosis Over A Period of 14 Years in the Tiran-Karvan Township, Isfahan, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(293): 1103-9

1- Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- PhD Candidate, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Abdollah Mohammadian-Hafshejan MSc, Email: a_mohamadii@yahoo.com

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

a. **Article**: Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. Brain Res. 2002;935(1-2):40-6.
b. **Chapter in a book**: Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
c. **Book**: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

14. **Proof Reading:** A computer prints out is sent to the corresponding author for proof reading before publication in order to avoid any mistakes. Corrections should be marked clearly and sent immediately to the Journal office.
15. **Abbreviations and symbols**: Use only standard abbreviations. **Avoid using them in the title and abstract**. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
16. The **corresponding author:** Will be supplied with 1 free issue.
17. **Ethical guidelines**: Ethical considerations must be addressed in the Materials and Methods. Please state that **informed consent** was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project.Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your Institute or agency.
18. **Conflicts of interest:** Authors must acknowledge and declare any sources of funding and potential conflicting interest, such as receiving funds or fees by, or holding stocks and shares in, an organization that may profit or lose through publication of your paper. Declaring a competing interest will not lead to automatic rejection of the paper, but we would like to be made aware of it.
19. **Page charges:** There are no charges for publication in this Journal.
20. **Copyright:** The entire contents of the Journal of Isfahan Medical School are protected under international copyrights. This Journal is for your personal noncommercial use. You may not modify copy, distribute, transmit, display, or publish any materials contained on the Journal without the prior written permission of it or the appropriate copyright owner.
21. **Peer review process:** All manuscripts are considered to be confidential. They are peer-reviewed by at least 3 anonymous reviewers selected by the Editorial Board. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor decision to accept, reject, or require modifications. If the manuscript is completely acceptable according to the criteria set forth in these instructions, it is scheduled for the next available issue.
22. Journal has entire right for accept or reject any of received manuscripts.
23. The editors, editorial board, sponsoring organization, and publisher do not accept responsibility for the statements expressed by authors in their contributions.
24. **Communicating with the Editorial Office:** We encourage you to communicate with the JIMS Editorial Office and to check on the status of a manuscript via journal site: (http://journals.mui.ac.ir/jims) only. For more in formations you can contact with JIMS office via E-mail address (jims@med.mui.ac.ir).

INSTRUCTION TO AUTHORS

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

Editorial Board (In alphabetical order)

1. **Mojtaba Abtahi** MD, Associate Professor of Otolaryngology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. **Khosrow Adeli** PhD, Professor of Clinical Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada
3. **Mohammad 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, Associate 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. 32, No. 293, 2nd week, September 2014

Isfahan University of Medical Sciences

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

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

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

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

Office:
P.O. Box 81744-176, Isfahan, I.R. IRAN
Telefax: +98 311 7922291
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: +98 311 6686302
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.