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 ۲۷۹/ هفته چهارم اردیبهشت ۱۳۹۳

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

Weekly Vol. 32, No. 279, 4th Week, May 2014

مقاله‌های پژوهشی

مطالعه‌ی ارتباط بین پلی‌مورفیسم A/G در ناحیه‌ی اینترونی ژن FGFR2 و سرطان پستان.....۳۵۹
دکتر مجید متولی باشی، مهسا غلام‌پور

بررسی ارتباط پاپیلوماویروس انسانی تیپ ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ با سرطان پستان.....۳۶۸
مسعود دوستی، دکتر مهران بخشش، دکتر شکوه تقی‌پور ظهیر، دکتر علیرضا حاتمی، محمد شایسته‌پور، دکتر منصور مقیمی

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن بهینه شده‌ی زیر واحد B کلرا توکسین به عنوان کاندید واکسن.....۳۷۸
دکتر شهرام نظریان، محمدعلی عارف‌پور، محمدجواد باقری‌پور، دکتر غلامرضا اولاد

تأثیر ۸ ماه تمرین مقاومتی بر سطوح GH (Growth hormone) و IGFBP۳ (Insulin-like growth factor binding protein۳) و IGF۱ (Insulin-like growth factor۱) پلاسمای دو بیمار مبتلا به سوختگی شدید.....۳۸۸
نسیم بهزادنژاد، سید محمد مرندی، دکتر فهیمه اسفرجانی، دکتر احمد عابدی، فرشته بردیا

مقاله مروری

نقش ریز مغذی‌ها در فعالیت بیماری آرتریت روماتوئید.....۴۰۸
دکتر سپیده حجازی، دکتر کامیلا هاشم‌زاده، دکتر مریم صاحباری

Original Articles

The Association of A/G Polymorphism in Intronic Region of FGFR2 Gene and Breast Cancer 367
Majid Motovali-Bashi PhD, Mahsa Gholampour

The Relationship of Low-Risk (6, 11) and High-Risk Types (16, 18) of Papilloma Virus and Human Breast Cancer in Women.....377
Masoud Doosti, Mehran Bakhshesh PhD, Shokouh Taghipour-Zahir PhD, Alirza Hatami, Mohammad Shayestehpour, Mansour Moghimi PhD

Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate.....387
Shahram Nazarian PhD, Mohhamad Ali Arefpour MSc, Mohhamd Javad Bagheripour, Golamreza Olad PhD

The Effect of Eight Months of Resistive Training on Growth hormone, Insulin-Like Growth Factor1 and Insulin-like Growth Factor Binding Protein3 Plasma Levels in Patients with Severe Burns 407
Nasim Behzadnezhad MSc, Sayyed Mohammad Marandi PhD, Fahimeh Esfarjani PhD, Ahmad Abedi PhD, Fereshteh Bardia MSc

Review Article

Role of the Trace Elements in Rheumatoid Arthritis.....415
Sepideh Hejazi MD, Kamila Hashemzadeh MD, Maryam Sahebari MD

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۷۹)، هفته چهارم اردیبهشت 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

مطالعه‌ی ارتباط بین پلی‌مورفیسم A/G در ناحیه‌ی اینترونی ژن FGFR۲ و سرطان پستان.....۳۵۹
دکتر مجید متولی باشی، مهسا غلام‌پور

بررسی ارتباط پاپیلوماویروس انسانی تیپ ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ با سرطان پستان.....۳۶۸
مسعود دوستی، دکتر مهران بخشش، دکتر شکوه تقی‌پور ظهیر، دکتر علیرضا حاتمی، محمد شایسته‌پور، دکتر منصور مقیمی

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن بهینه شده‌ی زیر واحد B کلرا توکسین به عنوان کاندید واکسن.....۳۷۸
دکتر شهرام نظریان، محمدعلی عارف‌پور، محمدجواد باقری‌پور، دکتر غلامرضا اولاد

تأثیر ۸ ماه تمرین مقاومتی بر سطوح GH (Growth hormone)، IGFBP۳ (Insulin-like growth factor binding protein۳) و IGF۱ (Insulin-like growth factor۱) پلاسمای دو بیمار مبتلا به سوختگی شدید.....۳۸۸
نسیم بهزادنژاد، سید محمد مرندی، دکتر فهیمه اسفرجانی، دکتر احمد عابدی، فرشته بردیا

مقاله مروری

نقش ریز مغذی‌ها در فعالیت بیماری آرتریت روماتوئید.....۴۰۸
دکتر سپیده حجازی، دکتر کامیلا هاشم‌زاده، دکتر مریم صاحباری

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۹/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۲

مطالعه‌ی ارتباط بین پلی‌مورفیسم A/G در ناحیه‌ی اینترونی ژن FGFR۲ و سرطان پستان

دکتر مجید متولی باشی[۱]، مهسا غلام‌پور[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گیرنده‌ی عامل رشد فیبروبلاستی۲ (FGFR۲ یا Fibroblast growth factor receptor۲) یک گیرنده‌ی تیروزین کینازی است که نقشی مهمی در رشد و تمایز سلول‌ها بر عهده دارد. بر اساس مطالعات همراهی ژن FGFR۲ به عنوان ژن مستعد به سرطان پستان می‌باشد. پلی‌مورفیسم rs۱۲۱۹۶۴۸ در ناحیه‌ی اینترونی ژن، ارتباط آماری قابل توجهی را با سرطان پستان نشان می‌دهد. FGFR۲ در ۱۵-۱۰ درصد از تومورهای پستان افزایش بیان می‌یابد. SNPs (Single-nucleotide polymorphisms) موجود در این ناحیه در افزایش بیان FGFR۲ نقش دارند. در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs۱۲۱۹۶۴۸ در ناحیه‌ی اینترون۲ ژن FGFR۲ با سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر بر روی ۸۰ بیمار و ۱۰۰ نفر از افراد سالم (گروه شاهد) انجام شد. پس از استخراج *DNA* از خون، توالی معین توسط تکنیک Tetra primer ARMS-PCR (Tetra primer amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction) تکثیر گردید و ژنوتیپ پلی‌مورفیسم C/T به وسیله‌ی الکتروفورز بر روی ژل آگارز به دست آمد.

یافته‌ها: افراد دارای ژنوتیپ G/G و G/A زمینه‌ی بیشتری برای ابتلا به سرطان پستان دارند (P = ۰/۰۱۸ و OR = ۵/۳۲). با این که فراوانی آللی G در افراد مورد نسبت به افراد شاهد افزایش یافت؛ اما این افزایش ارتباط معنی‌داری با سرطان پستان نشان نداد (P = ۰/۲۳۰).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی G/A در ناحیه‌ی اینترون۲ ژن گیرنده‌ی تیروزین کینازی FGFR۲ در استعداد سرطان پستان می‌تواند به عنوان عامل خطر ایفای نقش کند.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، ژن Fibroblast growth factor receptor۲

ارجاع: متولی باشی مجید، غلام‌پور مهسا. **مطالعه‌ی ارتباط بین پلی‌مورفیسم A/G در ناحیه‌ی اینترونی ژن FGFR۲ و سرطان پستان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۹): ۳۶۷-۳۵۹

مقدمه

سرطان پستان در نتیجه‌ی تجمع آسیب‌های ژنتیکی در سلول‌های اپیتلیال بافت سازنده‌ی شیر و کسب فنوتیپ‌های بدخیم توسط این سلول‌ها بروز می‌کند (۱). در مراحل اولیه‌ی سرطان پستان، سلول‌های سرطانی وجود دارند، اما در بافت‌های چربی پستان پخش نشده‌اند. به این مرحله کارسینومای درجا نیز گفته می‌شود. سرطان پستان تهاجمی به چهار مرحله تقسیم می‌شود. در مرحله‌ی اول و دوم اندازه‌ی تومور کوچک و احتمال درگیری گره‌های لنفاوی کم است.

۱- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید متولی باشی
Email: mbashi@sci.ui.ac.ir

در مرحله‌ی سوم، سلول‌های سرطانی به غدد لنفاوی رسیده‌اند، اما به بخش‌های دیگر بدن منتشر نشده‌اند. در مرحله‌ی چهارم که به مرحله‌ی متاستازی معروف است، سلول‌های سرطانی به بافت‌های دیگر بدن پخش می‌شوند (۲).

این سرطان شایع‌ترین سرطان در جوامع توسعه یافته و در حال توسعه است و یکی از فراوان‌ترین انواع بدخیمی‌ها در بین زنان ایران می‌باشد که نرخ بروز آن در حال افزایش است. در تومورهای سرطانی، مکانیسم‌های مولکولی و فرایندهای آنکوژنی مختلف نقش دارند. اختلال در مسیرهای سلولی باعث بروز سرطان می‌شود(۳).

گیرنده‌های عامل رشد فیبروبلاستی (FGFR یا Fibroblast growth factor receptor) از جمله گیرنده‌های تیروزین کینازی می‌باشند. ساختار این گیرنده‌ها دارای یک قسمت متصل شونده به لیگاند خارج سلولی، یک قسمت عبوری از غشا و یک قسمت درون سلولی تیروزین کینازی است. قسمت خارج سلولی از سه لوپ ایمونوگلوبولین و یک بخش اسیدی تشکیل شده است (۶-۴). با اتصال عوامل رشد فیبروبلاستی به گیرنده و دیمریزاسیون آن، چندین مسیر سیگنالی در پایین دست فعال می‌شوند. مهم‌ترین مسیرهای فعال شده، K3Pl (Phosphoinositide ۳-kinase) و نیز RAS-MAPK (RAS/mitogen activated protein kinase) هستند که با انتقال سیگنال باعث فعال شدن عوامل رونویسی می‌شوند (۷).

ترکیب FGFR، FGF (Fibroblast growth factor) و پروتئین‌های آداپتور یک شبکه‌ی سیگنالینگ پیچیده را ایجاد می‌کنند که نقش‌های اساسی در تکامل، ارگان‌زایی، تمایز سلول، رگ‌زایی (Angiogenesis) و پیشرفت تومور دارند (۸).

عوامل رشد فیبروبلاستی مختلف و گیرنده‌های مرتبط با آن‌ها بیان ویژه‌ی بافتی دارند (۴). الگوی بیان ویژه‌ی بافتی و تمایز در اتصال، میانکنش اختصاصی گیرنده- لیگاند را نشان می‌دهد. این اختصاصیت همچنین توسط پیرایش (Splicing) تنظیم می‌شود (۴). گیرنده‌ها در حالت عادی در بافت‌ها بیان می‌شوند و در رشد سلولی، تمایز و تکامل تعدادی از بافت‌ها از جمله پستان و کلیه نقش دارند (۹).

این خانواده‌ی گیرنده، دارای چهار عضو می‌باشد. ۴ ژن در موقعیت‌های مختلف کروموزومی شناسایی می‌شوند که پروتئین‌های مشابه خانواده‌ی FGFR را کد می‌کنند. گیرنده‌ی پنجم FGFR۵ با عنوان FGFRL۱ شناسایی شده است که توانایی اتصال به FGF را دارد، اما فاقد قسمت تیروزین کینازی است و به طور منفی سیگنال را تنظیم می‌کند (۱۰).

FGFRها در سرطان‌زایی نقش دارند و در تحقیقات اخیر برای اهداف دارویی در سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و از طریق چندین مکانیسم باعث ایجاد بدخیمی‌ها و تکثیر تومور می‌شوند. در بیشتر موارد تکثیر ژن‌ها، افزایش بیان یا موتاسیون گیرنده‌های تیروزین کیناز باعث سرطانی شدن می‌شود (۱۱-۱۰). با تغییر در سطح FGFRها در اثر موتاسیون نقطه‌ای، بیان افزایش می‌یابد و یا پیرایش (Splicing) متفاوت باعث تغییر سیگنال FGFR می‌شود و در تومورهای متنوعی از انسان شناسایی شده است (۱۲). برای مثال، افزایش بیان FGFR در تعدادی از بافت‌ها شامل پستان، پروستات،

ملانوما و تیروئید مشاهده شده است (۱۱). FGFR۲ در ۱۵-۱۰ درصد از تومورهای پستان افزایش بیان می‌یابد (۱۳). همچنین بر اساس مطالعات انجام شده، بیان FGFR۲ در رده‌ی سلولی سرطان پستان نسبت به رده‌ی سلولی بافت طبیعی پستان ۴۰ برابر افزایش می‌یابد (۱۴).

بر اساس مطالعات صورت گرفته، FGFR۲ به عنوان یک ژن مستعد در سرطان پستان شناسایی شده و ژن کد کننده‌ی آن در ناحیه‌ی ۱۰q۲۶ قرار گرفته است که واجد ۲۲ اگزون و ۲۱ اینترون می‌باشد (۱۶-۱۵). چندین SNP (Single-nucleotide polymorphisms) در ناحیه‌ی اینترون۲ ژن FGFR۲ یافت شده است که همراهی زیادی با خطر ابتلا به سرطان پستان نشان می‌دهند (۱۷-۱۶، ۴).

تحقیقات نشان داده است که توالی اینترون۲ یک ناحیه‌ی تنظیمی است و SNPها، سایت‌های اتصال عوامل رونویسی را تغییر می‌دهند و سطح بیان FGFR۲ را تنظیم می‌کنند. تفاوت در تمایل اتصال عوامل رونویسی می‌تواند باعث افزایش بیان FGFR۲ گردد (۱۸، ۴). به دلیل ارتباط پلی‌مورفیسم rs۱۲۱۹۶۴۸ با خطر ابتلا به سرطان پستان در مطالعات قبلی و این که این پلی‌مورفیسم در جمعیت ایرانی مورد مطالعه قرار نگرفته بود، این پلی‌مورفیسم انتخاب شد. در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار در ایران ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs۱۲۱۹۶۴۸ در اینترون۲ ژن FGFR۲ با خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع مورد- شاهد و بازگشت به گذشته روی ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ فرد سالم (گروه شاهد) انجام گرفت. بیماران همه از ساکنین استان اصفهان بودند که جهت درمان به بیمارستان مراجعه نموده بودند. بعد از تکمیل فرم رضایت‌نامه توسط بیماران، بر اساس پرونده‌های مطالعه شده و تکمیل پرسش‌نامه، اطلاعات اولیه شامل سن، تعداد فرزندان، مرحله‌ی سرطان و مرحله‌ی متاستاز جمع‌آوری گردید. محدوده‌ی سنی بیماران حدود ۳ ± ۴۸ سال بود. تمام بیماران زنانی با حداقل یک بار حاملگی بودند، در نتیجه از نظر جنسیت و سایر شرایط اختلاف چندانی با هم نداشتند.

استخراج DNA

حدود ۵۰۰ میکرولیتر خون به ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و با روش رسوب نمکی Miller و با کمی تغییرات DNA ژنومی استخراج گردید (۱۹). رسوب DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل شد و سپس با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین غلظت گردید.

تعیین ژنوتیپ SNP ژن FGFR۲

تعیین ژنوتیپ با روش Tetra primer ARMS-PCR (Tetra primer amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction) انجام شد. در این تکنیک، ۴ نوع پرایمر با استفاده از نرم‌افزار OLIGO طراحی شد (جدول ۱). طول پرایمرها و دمای اتصال هر ۴ پرایمر توسط این نرم‌افزار مورد بررسی قرار گرفت. مناسب‌ترین توالی پرایمرها که طول و دمای نزدیک به هم داشتند، انتخاب شدند تا به صورت همزمان در واکنش PCR عمل کنند. به منظور بررسی اختصاصیت هر جفت پرایمر و عدم اتصال آن به قسمت‌های دیگر ژنوم از برنامه‌ی Blast استفاده گردید.

پرایمر IF و OR باعث تکثیر آلل T و ایجاد باندی به طول ۱۷۸ بر روی ژل آگارز می‌شود. همچنین آلل C توسط پرایمرهای OF و IR تکثیر و باند ۲۸۷ جفت بازی ایجاد می‌کند. از این طریق، افراد هتروزیگوت و هموزیگوت قابل شناسایی هستند. پرایمرهای OF و OR به عنوان شاهد مثبت باندی به طول ۴۲۳ جفت بازی پس از PCR و الکتروفورز ایجاد می‌کنند.

مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر عبارت از ۱۰۰ نانوگرم DNA به عنوان الگو، ۵ پیکومول از پرایمر (OF و OR یا OR و IF)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$، ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (Deoxynucleotide triphosphates) ۱۰ میلی‌مولار و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم DNA پلی‌مراز Taq بودند.

تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf آلمان با شرایط دمایی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره‌ی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای چسبیدن ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد برای پرایمرها به مدت ۳۵ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام پذیرفت. پس از پایان چرخه‌های تکثیر محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز شدند.

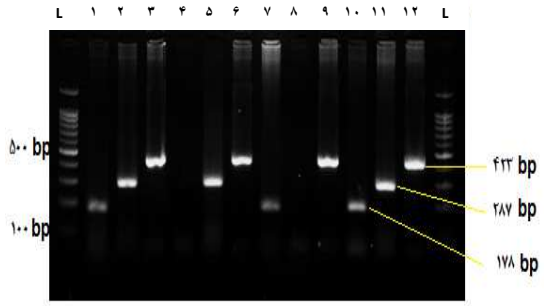
برای محاسبات آماری از روش مطالعه‌ی مورد-شاهد استفاده شد. در این نوع مطالعه، افراد بیمار از جمعیت انتخاب می‌شوند و یک گروه شاهد مناسب بدون بیماری هم انتخاب می‌شوند. ژنوتیپ افراد دو گروه تعیین می‌شود و همراهی بین بیماری و ژنوتیپ با نسبت احتمال (OR یا Odds ratio) محاسبه می‌شود. برای آنالیز آماری نتایج از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد.

یافته‌ها

ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ژن FGFR۲ ۸۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۰ فرد سالم توسط تکنیک Tetra primer ARMS-PCR و سپس ژنوتیپ افراد بر اساس الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز مشخص شد. افراد هتروزیگوت قطعات به طول مورد انتظار حدود ۱۷۸ و ۲۸۷ جفت بازی به همراه باند شاهد ۴۲۳ جفت بازی ایجاد کردند؛ در صورتی که افراد دارای آلل مغلوب، دو باند ۲۸۷ و ۴۲۳ جفت بازی را روی ژل الکتروفورز نشان دادند (شکل ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن FGFR۲

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی (′۳ > ′۵)	اندازه‌ی محصول	
IF (آغازگر رفت آلل T)	CATGGCCATCCTTGAAGgGT	۱۷۸ جفت باز	
OR (آغازگر برگشت آلل T)	GCCTTGGCTATTCAGAGGCTAAG	۱۷۸ جفت باز	شاهد مثبت
OF (آغازگر رفت آلل C)	CATGATGTGGCCAAAGTCCAC	۲۸۷ جفت باز	۴۲۳ جفت باز
IR (آغازگر برگشت آلل C)	CGCCTATTTTACTTGACACcCG	۲۸۷ جفت باز	



شکل ۱. محصول Tetra primer ARMS-PCR (Tetra primer amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction) روی ژل آگارز، ۱، ۲ و ۳: نمونه‌ی فرد هتروزیگوت. ۴، ۵ و ۶: نمونه‌ی فردی با ژنوتیپ مغلوب، ۷، ۸ و ۹: نمونه‌ی فرد با ژنوتیپ غالب، ۱۰، ۱۱ و ۱۲: نمونه‌ی فرد هتروزیگوت. الکتروفورز با شرایط ۱/۵ درصد غلظت آگارز با ولتاژ ۸۰ و آمپر ثابت به مدت ۴۰ دقیقه انجام گرفت.

پس از تعیین فراوانی ژنوتیپ‌ها و فراوانی آلل‌ها برای پلی‌مورفیسم مورد مطالعه، مقدار χ^2 محاسبه شد. بر اساس میزان χ^2 محاسبه شده و مقایسه‌ی آن با جدول احتمال، نمونه‌ها و جمعیت مورد مطالعه متعادل در نظر گرفته شدند. ارتباط آماری معنی‌داری بین آلل‌های A و G و سرطان پستان مشاهده نشد (P = ۰/۲۳۰). اطلاعات مربوط به فراوانی آللی در جدول ۲ آمده است. در این مطالعه، نسبت ژنوتیپ‌های حداقل دارای یک آلل G با افراد فاقد این آلل مقایسه شد. خطر ابتلا به سرطان پستان در بیماران حامل ژنوتیپ‌های G/G + G/G حدود ۵ برابر بود (P = ۰/۰۱۸ و OR = ۵/۳۲) (جدول ۳).

بر اساس آنالیزهای آماری ۵۶ درصد از بیماران بررسی شده در مرحله‌ی ۱ و ۲ و حدود ۳۶ درصد در مرحله‌ی ۳ از سرطان پستان بودند و تنها ۸ درصد بیماران (۴ بیمار) در مرحله‌ی متاستازی بودند. به دلیل فراوانی پایین بیماران متاستازی، ارتباط پلی‌مورفیسم با متاستاز بررسی نشد. از آن جایی که در شهرهای بزرگ به دلیل بهداشت و رسیدگی، سرطان پستان قبل از متاستاز تشخیص داده می‌شود و در حال کنترل می‌باشد، در نتیجه در جمعیت مورد بررسی تعداد بیماران متاستازی بسیار کم بود. در این مطالعه احتمال ارتباط پلی‌مورفیسم با متاستاز وجود نداشت.

جدول ۲. فراوانی آللی FGFR۲ و ارتباط آن با سرطان پستان

آلل	مورد		شاهد		کل		مقدار P
	فراوانی آللی	تعداد	فراوانی آللی	تعداد	فراوانی آللی	تعداد	
A	۰/۴۸	۷۷	۰/۵۴۵	۱۰۹	۰/۵۲	۱۸۶	۰/۲۳۰
G	۰/۵۲	۸۳	۰/۴۵۵	۹۱	۰/۴۸	۱۷۴	

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپ FGFR۲ در افراد گروه‌های مورد و شاهد

ژنوتیپ	OR (CI ٪۹۵)	مورد تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	مقدار P
AA	a = ۵/۳۲ (۱/۲۸–۲۱/۸)	۲ (۲/۵)	۱۲ (۱۲/۰)	a = ۰/۰۱۸
AG	b = ۲/۱۷ (۰/۵۵–۸/۴۲)	۷۳ (۹۱/۲)	۸۵ (۸۵/۰)	b = ۰/۴۷۰
GG		۵ (۶/۳)	۳ (۳/۰)	

a: ژنوتیپ G/G + A/G در مقایسه با ژنوتیپ A/A، b: ژنوتیپ G/G در مقایسه با ژنوتیپ A/G + A/A

OR: Odds ratio; CI: Confidence interval

بحث

امروزه در درمان سرطان به فرایندها و مکانیسم‌های مولکولی که در سرطان‌زایی دخیلند، توجه می‌شود. برای به کارگیری درمان‌های جدید، شناسایی این مکانیسم‌ها مورد نیاز است. FGFRها در سرطان‌زایی نقش دارند و در مطالعات اخیر برای اهداف دارویی در سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

در بین بیماران مبتلا به سرطان پستان، تکثیر FGFR۲ مشاهده شده است. این گیرنده در چندین فرایند شامل تکثیر، رگ‌زایی و مهاجرت سلول‌ها نقش دارد (۱۰، ۴). سلول‌هایی که بیان بالایی از FGFR۲ دارند، تنوع در توالی اینترون۲ که محل اتصال عوامل رونویسی است، نشان می‌دهند (۵).

توالی اینترون۲ یک ناحیه‌ی تنظیمی است. SNPها سایت‌های اتصال عوامل رونویسی را تغییر می‌دهند و در نتیجه، سطح بیان FGFR۲ را تنظیم می‌کنند. تفاوت در تمایل اتصال عوامل رونویسی، باعث افزایش بیان FGFR۲ با آلل‌هایی با خطر بالا می‌شود (۴). افزایش بیان FGFR۲ باعث افزایش سیگنال پایین دست می‌گردد. بنابراین، مسیرهایی که در تکثیرسلولی، تمایز، مهار آپوپتوز و مهاجرت نقش دارند، فعال می‌شوند.

در مطالعه‌ی حاضر که برای اولین بار در ایران صورت گرفت، فراوانی آللی و ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs۱۲۱۹۶۴۸ در جمعیت اصفهان محاسبه شد. بر اساس نتایج به دست آمده، ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم و سرطان پستان وجود ندارد (P = ۰/۲۳۰ و X^2 = ۵/۶). در صورتی که ژنوتیپ افراد بیمار دارای آلل خطر G (G/G + G/G) با سرطان پستان همراهی نشان می‌دهد (X^2 = ۵/۶ و P= ۰/۰۱۸). در مطالعات قبلی توسط Hunter ارتباط چهار پلی‌مورفیسم rs۱۲۱۹۶۴۸، rs۲۴۲۰۹۴۶، rs۱۱۲۰۰۰۱۴ و rs۲۹۸۱۵۷۹ در این ناحیه‌ی ژن FGFR۲ در جمعیت اروپایی با سرطان پستان مشخص شد (۱۶). همچنین، پلی‌مورفیسم rs۱۲۱۹۶۴۸ در ناحیه‌ی اینترون۲ (FGFR۲) در جمعیت‌های دیگر از جمله آسیایی (۲۰) و اسرائیلی (۱۵) نیز با سرطان پستان همراهی نشان دادند.

در همه‌ی مطالعات پیشین، ژنوتیپ مینور با سرطان پستان همراهی نشان می‌دهد. در صورتی که در مطالعه‌ی حاضر ژنوتیپ مینور به تنهایی ارتباط معنی‌داری با سرطان پستان نداشت (P = ۰/۴۷۰)؛ اما ژنوتیپ افراد بیمار دارای آلل خطر G (G/G + A/G) با سرطان پستان همراهی نشان داد (P = ۰/۰۱۸ و OR = ۵/۳۲) و ارتباط این پلی‌مورفیسم به صورت غالب است.

در مطالعه‌ی Zhang و همکاران، به صورت غالب و مغلوب بین پلی‌مورفیسم حاصل و سرطان پستان ارتباط مشاهده شد و این SNP به عنوان نشانگر مهم در سرطان پستان پیشنهاد شد (۲۱). مطالعات روی بیان FGFR۲ نشان دادند که در سلول‌هایی با هاپلوتیپ‌های مینور، میزان بیان FGFR۲ افزایش می‌یابد. به دلیل این که عوامل رونویسی oct۱/Runx۲ و C/EBPβ (proteinβCCAAT/enhancer binding) با تمایل بالاتری به آلل هموزیگوت مینور در ناحیه‌ی اینترون۲ متصل می‌شوند و باعث افزایش بیان FGFR۲ می‌شوند؛ افزایش بیان FGFR۲ خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می‌دهد (۲۲).

در مطالعه‌ی حاضر، افراد هموزیگوت و هتروزیگوت برای آلل خطر G همراه با هم با سرطان

همراهی نشان می‌دهند. تفاوت نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی می‌تواند به دلیل تفاوت در نقشه‌ی ژنتیکی جمعیت‌ها و همچنین، دخیل بودن عوامل دیگر باشد. نمونه‌های مورد مطالعه از یک ناحیه‌ی جمعیتی می‌باشد که به طور تصادفی انتخاب شده بودند و فراوانی افراد هتروزیگوت در جمعیت زیاد (۹۱/۲ درصد) بود و این امر باعث شد تا افراد هموزیگوت G/G ارتباط معنی‌داری با بیماری نشان ندهند. در صورتی که در مطالعات قبلی، جمعیت‌های خیلی بزرگ مورد بررسی قرار گرفته‌اند. برای به دست آوردن نتایج دقیق‌تر، بهتر است نمونه‌های مورد مطالعه از نواحی مختلف جمعیت ایرانی انتخاب شوند.

تشکر و قدردانی

از معاونین محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و نیز سرکار خانم دکتر سیمین همتی متخصص انکولوژی بابت پشتیبانی مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین، از بیماران مبتلا به سرطان پستان شرکت کننده در طرح و کارکنان زحمت‌کش بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان به دلیل همکاری در طرح سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Ghafoor A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Thun M. Trends in breast cancer by race and ethnicity. CA Cancer J Clin 2003; 53(6): 342-55.
2. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. Surg Clin North Am 2003; 83(4): 803-19.
3. Yavari P, Mosavizadeh M, Sadrol-Hefazi B, Mehrabi Y. Reproductive characteristics and the risk of breast cancer--a case-control study in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2005; 6(3): 370-5.
4. Tenhagen M, van Diest PJ, Ivanova IA, van der Wall E, van der Groep P. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects, and possible drug targets. Endocr Relat Cancer 2012; 19(4): R115-R129.
5. McLeskey SW, Ding IY, Lippman ME, Kern FG. MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. Cancer Res 1994; 54(2): 523-30.
6. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. Bioessays 2000; 22(2): 108-12.
7. Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. Biochem J 2011; 437(2): 199-213.
8. Kondo T, Zheng L, Liu W, Kurebayashi J, Asa SL, Ezzat S. Epigenetically controlled fibroblast growth factor receptor 2 signaling imposes on the RAS/BRAF/mitogen-activated protein kinase pathway to modulate thyroid cancer progression. Cancer Res 2007; 67(11): 5461-70.
9. Martin AJ, Grant A, Ashfield AM, Palmer CN, Baker L, Quinlan PR, et al. FGFR2 protein expression in breast cancer: nuclear localisation and correlation with patient genotype. BMC Res Notes 2011; 4: 72.
10. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. Nat Rev Cancer 2010; 10(2): 116-29.
11. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. Endocr Relat Cancer 2001; 8(3): 161-73.
12. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Endocr Relat Cancer 2000; 7(3): 165-97.
13. Rebbeck TR, DeMichele A, Tran TV, Panossian S, Bunin GR, Troxel AB, et al. Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. Carcinogenesis 2009; 30(2): 269-74.
14. Tannheimer SL, Rehemtulla A, Ethier SP. Characterization of fibroblast growth factor receptor 2 overexpression in the human breast cancer cell line SUM-52PE. Breast Cancer Res 2000; 2(4): 311-20.

15. Raskin L, Pinchev M, Arad C, Lejbkowicz F, Tamir A, Rennert HS, et al. FGFR2 is a breast cancer susceptibility gene in Jewish and Arab Israeli populations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17(5): 1060-5.
16. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. Nat Genet 2007; 39(7): 870-4.
17. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. Nature 2007; 447(7148): 1087-93.
18. Sun C, Olopade OI, Di RA. rs2981582 is associated with FGFR2 expression in normal breast. Cancer Genet Cytogenet 2010; 197(2): 193-4.
19. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3): 1215.
20. Liang J, Chen P, Hu Z, Zhou X, Chen L, Li M, et al. Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women. Carcinogenesis 2008; 29(12): 2341-6.
21. Zhang J, Qiu LX, Wang ZH, Leaw SJ, Wang BY, Wang JL, et al. Current evidence on the relationship between three polymorphisms in the FGFR2 gene and breast cancer risk: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat 2010; 124(2): 419-24.
22. Meyer KB, Maia AT, O'Reilly M, Teschendorff AE, Chin SF, Caldas C, et al. Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. PLoS Biol 2008; 6(5): e108.

Journal of Isfahan Medical School Received: 17.01.2014

Vol. 32, No. 279, 4th Week, May 2014 Accepted: 11.04.2014

The Association of A/G Polymorphism in Intronic Region of FGFR2 Gene and Breast Cancer

Majid Motovali-Bashi PhD[1], Mahsa Gholampour[2]

Original Article

Abstract

Background: Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is a receptor of tyrosine kinase with a pivotal role in the cell growth and differentiation. FGFR2 gene was identified as susceptibility gene for breast cancer by Genome-wide associated study. rs1219648 polymorphisms in intronic region are associated with breast cancer. FGFR2 gene is amplified in 15-10% of breast tumors. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of this region are involved in FGFR2 amplification. In this study, the association of rs1219648 in intron 2 region of FGFR2 gene and breast cancer was assessed.

Methods: In the present study, 80 cases of breast cancer and 100 healthy controls were studied. After DNA extraction from blood, specific sequence was amplified by tetra primer ARMS-PCR (amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction) technique and genotype of C/T polymorphism was determined by agarose gel electrophoresis.

Findings: Individuals with G/G and A/G genotype were at a significantly higher risk of breast cancer (OR = 5.32, P = 0.018). G allele frequency in case patients were greater than controls but this increase did not show significant relationship with breast cancer (P = 0.230).

Conclusion: Single nucleotide polymorphism of G/A in intron 2 of the FGFR2 tyrosine kinase receptor gene may play a role as a risk factor for breast cancer susceptibility.

Keywords: Breast cancer, Single nucleotide polymorphism, FGFR2 gene

Citation: Motovali-Bashi M, Gholampur M. **The Association of A/G Polymorphism in Intronic Region of FGFR2 Gene and Breast Cancer.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(279): 359-67

1- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- MSc Student, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Majid Motovali-Bashi PhD, Email: mbashi@sci.ui.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۹/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۷

بررسی ارتباط پاپیلوماویروس انسانی تیپ ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ با سرطان پستان

مسعود دوستی[۱]، دکتر مهران بخشش[۲]، دکتر شکوه تقی‌پور ظهیر[۳]، دکتر علیرضا حاتمی[۲]، محمد شایسته‌پور[۴]، دکتر منصور مقیمی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پاپیلوماویروس یکی از عوامل ویروسی مطرح در بروز و تکامل سرطان پستان و سرویکس است. این مطالعه به منظور بررسی ارتباط تیپ‌های پرخطر ۱۶ و ۱۸ و کم خطر ۶ و ۱۱ پاپیلوماویروس انسانی (HPV یا Human papillomavirus) با بروز سرطان پستان در مراجعین زن بیمارستان شهید صدوقی شهر یزد صورت گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، ۸۷ مورد بافت سرطانی پستان و ۸۴ مورد بافت پستانی بدون ضایعه‌ی بدخیمی (فیبروکیستیک) از مراجعین بیمارستان شهید صدوقی یزد انتخاب شدند. به منظور تعیین تیپ‌های پر خطر و کم خطر پاپیلوماویروس، ابتدا از روش Nested PCR (Nested polymerase chain reaction) و سپس PCR با پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.

یافته‌ها: ۲۲/۹ درصد نمونه‌ها دارای ژنوم ویروس پاپیلوما بودند که ۱۸/۳ درصد آن‌ها دارای ژنوتیپ‌های موکوسی ۱۱، ۱۶، ۱۸ و ۶ بودند. بیشترین فراوانی ژنوتیپی پاپیلوما در کارسینوما داکتال مهاجم و مربوط به تیپ ۱۶ بود. به طور کلی، در بین ژنوتیپ‌های پیش‌گفته، تیپ ۶ فراوان‌ترین ژنوتیپ مرتبط با سرطان پستان بود (۳۵ درصد) و تیپ ۱۱ کمترین ارتباط را با این نوع سرطان (۵ درصد) داشته است.

نتیجه‌گیری: با انجام این مطالعه، ارتباط احتمالی عفونت ویروس پاپیلومای انسانی (به ویژه تیپ ۱۶) در بروز و تکامل بدخیمی‌های پستان در بیماران شهر یزد مورد تأیید قرار گرفت. بین نوع و فراوانی ژنوتیپ با نوع بافت و آسیب‌شناسی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، ژنوتیپ، ویروس پاپیلومای انسانی، آزمایش Polymerase chain reaction

ارجاع: دوستی مسعود، بخشش مهران، تقی‌پور ظهیر شکوه، حاتمی علیرضا، شایسته‌پور محمد، مقیمی منصور. **بررسی ارتباط پاپیلوماویروس انسانی تیپ ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ با سرطان پستان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۹): ۳۷۷-۳۶۸

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های تشخیص داده شده در زنان اکثر نقاط جهان از جمله ایران می‌باشد. میزان بروز کارسینومای پستان در طی ۲۵ سال اخیر، افزایش بیش از ۴۰ درصد را نشان می‌دهد (۲-۱). علت اصلی سرطان پستان ناشناخته باقی مانده است. بسیاری از عوامل خطر در ارتباط با پاتوژنز این بیماری شناخته شده‌اندکه می‌توان به

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش تحقیق وتشخیص بیماری‌های ویروسی دام، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
۲- استادیار، بخش تحقیق وتشخیص بیماری‌های ویروسی دام، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
۳- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهران بخشش
Email: m.bakhshesh@ac.ir

سابقه‌ی خانوادگی، هورمون‌ها و استعمال دخانیات اشاره کرد (۴-۳). اگر چه عوامل ژنتیکی در ایجاد سرطان مهم هستند، اما تنها مسبب ۱۰ درصد موارد سرطان پستان می‌باشند. بنابراین در اکثرموارد سرطان پستان، عوامل خطر محیطی نیز دخیل هستند. شواهدی مبنی بر افزایش بروز سرطان پستان در افراد مهاجر از کشورهایی با بروز پایین به نقاط جغرافیایی با بروز بالای سرطان پستان وجود دارد (۴).

عفونت‌های ویروسی نیز به عنوان عامل سببی محیطی در مطالعات مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۵). اطلاعات به دست آمده از این تحقیقات در بیوپسی‌های سرطان پستان و رده‌های سلولی متناقض می‌باشند. نشان داده شده است که ۳ عامل شامل عوامل ژنتیکی و ارثی، هورمونی و یک عامل منتقله از طریق شیر موش مادر در ایجاد تومور پستان در موش‌ها دخالت دارند (۳). مطالعات نشان دادکه این عامل قابل انتقال، ویروسی از خانواده‌ی رتروویروس‌ها به نام ویروس توموری موش (Mouse mammary tumor virus یا MMTV) می‌باشد (۶). سال‌ها بعد شواهدی مبنی بر دخالت ویروسی مشابه، به نام ویروس توموری همگون با انسان (Human homologue of the mouse mammary یا HHMMT) به عنوان عامل کمکی در روند ایجاد تومور پستان در انسان به دست آمد (۶). همچنین نقش ویروس‌های خانواده‌ی هرپس ویریده به عنوان عامل ایجاد این نوع سرطان مورد توجه قرار گرفته واین نتایج توسط سایر محققین مورد بحث است (۷-۶).

در دو دهه‌ی اخیر، شواهدی مبنی بر دخالت پاپیلوماویروس انسانی (HPV یا Human papillomavirus) در شروع و یا تحریک روند ایجاد سرطان پستان به دست آمده است (۸، ۵). ارتباط بین ویروس پاپیلومای انسانی و تومورهای مقعدی- تناسلی به خصوص سرطان دهانه‌ی رحم به خوبی شناخته شده است، اما این ارتباط در مورد سرطان پستان به خوبی روشن نیست و نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه احساس می‌شود (۱۰-۹). با وجود مطالعات فراوان در این زمینه، نقش ویروس پاپیلومای انسانی در تومورهای بدخیم پستان مورد بحث و تناقص است. گزارش‌های متعددی حاکی از حضور ژنوم پاپیلوماویروس انسانی در سلول‌های سرطانی سینه هستند که شیوع تقریبی ۸۶-۴ درصد در نقاط مختلف جغرافیایی جهان را نشان می‌دهد (۱۳-۱۱).

حضور تیپ‌های پرخطر HPV-۱۸، HPV-۱۶ و HPV-۳۳ در نمونه‌های سرطان پستان از جمعیت‌های مختلف سراسر جهان مانند ایتالیا، چین، ژاپن،آمریکا، اتریش، برزیل، استرالیا، تایوان، ترکیه،کره و سوریه به اثبات رسیده است (۱۳-۱۲). با توجه به این که تحقیقات اندکی در این زمینه در کشور ایران صورت گرفته است، مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی ارتباط تیپ‌های مهم پاپیلوماویروس انسانی (تیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸) با سرطان پستان طراحی شد. نتایج این پژوهش نشان دهنده‌ی نقش احتمالی پاپیلوماویروس در ایجاد سرطان پستان به عنوان عامل اصلی یا کمکی است. این مطالعه، تعیین کننده‌ی فراوان‌ترین ژنوتیپ رایج موجود در تومورهای پستان در قسمتی از کشور ایران (شهر یزد) است. در صورتی که نتایج این پژوهش و تحقیقات بعدی در آینده، نقش پاپیلوماویروس را در ایجاد سرطان پستان پررنگ

جلوه دهند، شاید بتوان با به کارگیری راهکارهای مناسب پیشگیرانه، مانند واکسیناسیون، موارد بروز این نوع سرطان را کاهش داد و یا روندگسترش آن را محدود نمود.

روش‌ها

نمونه‌ها

طی این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، ۸۷ مورد سرطان پستان تأیید شده توسط دو پاتولوژیست از نمونه‌های ماستکتومی به منظور بررسی عفونت ویروس پاپیلومای انسانی انتخاب شدند. بافت کافی تومورال و عدم نکروز و خونریزی از معیارهای ورود نمونه‌ها به این مطالعه بودند. همچنین ۸۴ نمونه از بافت‌های غیر سرطانی پستان به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. سن بیماران انتخابی مبتلا به سرطان پستان ۷۵-۲۲ سال و اندازه‌ی تومور ۵-۰/۵ سانتی‌متر بود. در بین نمونه‌ها از نظر آسیب‌شناسی سرطان، کارسینوما داکتال مهاجم با ۶۷ مورد (۷۷ درصد) بیشترین نوع را تشکیل می‌داد. سایر نمونه‌ها شامل ۱۴ موردکارسینوما لوبولار مهاجم (۱۶/۱ درصد) و ۶ مورد کارسینوم مدولاری (۶/۹ درصد) بودند. لازم به ذکر است که همه‌ی این بیماران با توده‌ی پستانی به کلینیک مراجعه کردند و طی بررسی های انجام شده، ضایعه‌ی بدخیمی در سایر قسمت‌های بدن به غیر از پستان نداشتند.

برش‌گیری و آماده‌سازی نمونه‌ها

برش بافت‌های پارافینه‌ی آرشیوی با استفاده از دستگاه میکروتوم صورت گرفت. ابتدا سطح بلوک با یک تیغ جراحی خراشیده شد و سپس چند برش ۵ میکرومتری از بلوک پارافینه زده شد و در یک لوله‌ی میکروفیوژ ۲ میلی‌لیتری استریل جمع‌آوری گردید. جهت حذف پارافین نمونه، مقدار ۱ میلی‌لیتر گزیلول به لوله‌ی حاوی نمونه‌ی بافت اضافه شد، درب لوله بسته و در انکوباتور شیکردار به مدت ۳۰ دقیقه با دور پایین در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. لوله‌ها به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید و با تخلیه‌ی مایع رویی، دوباره برای ۲ مرتبه سانتریفوژ شد. سپس بافت در رقت‌های اتانول ۱۰۰ درجه، ۸۰ درجه، ۶۰ درجه و ۴۰ درجه قرار گرفت. در پایان، پس از شستشو با آب مقطر، اتانول با دقت حذف شد و لوله‌ی حاوی رسوب بافت درون انکوباتور قرار گرفت تا اتانول باقی مانده، به طور کامل تبخیر گردد.

استخراج اسید نوکلئیک

پس از هضم بافت‌ها توسط‌آنزیم پروتئیناز K (پروتکل شرکت سیناژن ایران) جهت استخراج DNA از کیت Amplisense استفاده گردید. بر طبق دستورالعمل کیت شرکت سازنده (Amplisense: russia DNA/RNA extraction)، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده (در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) به نمونه‌ها اضافه گردید و پس از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بقیه‌ی مراحل استخراج بر طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

آزمایش Polymerase chain reaction (PCR)

جهت ارزیابی نمونه‌ها، ابتدا آزمایش Nested PCR (Nested polymerase chain reaction) به کار رفت. در این آزمایش از پرایمرهای MY۰۹ (CGTCCMARRGGAWACTGATC) و MY۱۱ (GCMCAGGGWCATAAYAATGG) به عنوان

پرایمرهای خارجی و در ادامه از آغازگرهای داخلی GP5+ (AAAAATAAACTGTAAATCATATTC) و GP6+ (TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC) استفاده شد. محصولات PCR حاصل به ترتیب شامل ۴۵۰ و ۱۵۰ جفت باز بودند.

جهت انجام اولین مرحله‌ی PCR، ۰/۵ میکرولیتر Taq polymerase، ۴ میکرولیتر $MgCl_2$، یک میکرولیتر (Deoxynucleotide triphosphates) DNTP، ۵ میکرولیتر Buffer۱۰x، ۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای MY۰۹ و MY۱۱، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۲۴/۵ میکرولیتر DEPC water (Diethylpyrocarbonate water) به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مورد استفاده قرارگرفت.

مراحل سیکل PCR در این مرحله، شامل یک سیکل زمانی شامل ۵ دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد؛ ۳۸ سیکل زمانی شامل یک دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک سیکل پایانی شامل یک دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی گراد، یک دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۷ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. همچنین برای انجام مرحله‌ی دوم PCR از ۰/۵ میکرولیتر Taq polymerase، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، یک میکرولیتر DNTP، ۵ میکرولیتر Buffer۱۰x، ۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای GP5+ و GP6+، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۲۶ میکرولیتر DEPC water به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر استفاده شد.

مراحل سیکل PCR مرحله‌ی دوم عبارت از یک سیکل زمانی شامل ۵ دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱/۵ دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱/۵ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۸ سیکل زمانی شامل یک دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱/۵ دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱/۵ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و یک سیکل پایانی شامل یک دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱/۵ دقیقه ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۷ دقیقه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بودند.

فراورده‌ی PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی به وسیله‌ی اتیدیوم بروماید، نمایان گردید. نمونه‌هایی که در آن‌ها حضور ژنوم پاپیلوماویروس توسط آزمایش Nested PCR تأییدگردید، انتخاب شدند. جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌های مثبت شده به وسیله‌ی آزمایش PCR، از کیت‌های تجاری AmpliSens®HPV$_{6/11}$-EPH (شماره‌ی کاتالوگ V11-50F-CE) و AmpliSens®HPV$_{16/18}$-EPH (شماره‌ی کاتالوگ V12-100-R02) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج PCR با پرایمرهای اختصاصی

در شکل ۱ تصاویر ژل الکتروفورز و باندهای اختصاصی حاصل ازآزمایش PCR با پرایمرهای GP5+/GP6+ و MY۰۹/MY۱۱ نشان داده شده است.

از بین ۸۷ نمونه‌ی بافتی سرطان پستان، ۲۲/۹ درصد موارد دارای ژنوم ویروس پاپیلوما بودندکه در ۱۸/۳ درصد موارد، ژنوتیپ‌های موکوزال ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ ردیابی شدند. همچنین در بین ۸۴ بافت غیر سرطانی که به عنوان شاهد به کار رفته بودند، هیچ کدام از این ژنوتیپ‌ها یافت نشد.

فراوانی ژنوتیپ‌های ویروس پاپیلوما بر اساس نوع بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی

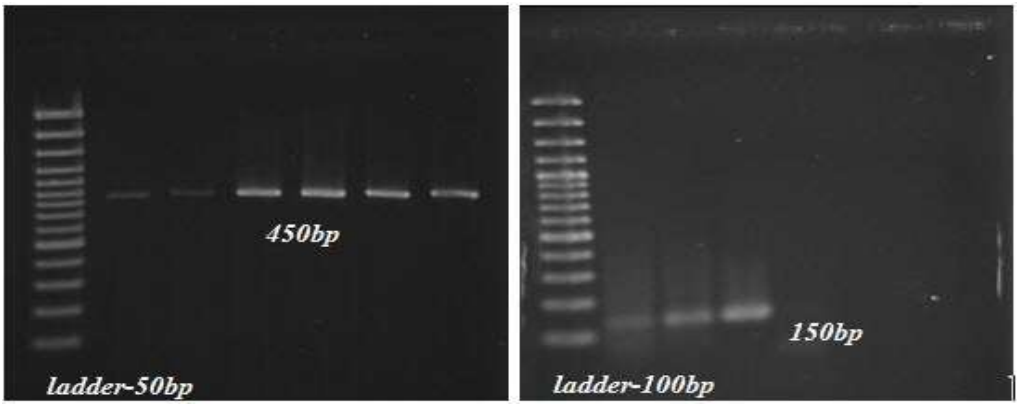
در جدول ۱ میزان و درصد ژنوتیپ‌های پاپیلوماویروس با توجه به نوع بافت سرطانی پستان به صورت تفکیک شده آمده است. همان‌طورکه ملاحظه می‌گردد، بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ ۱۶ است (۳۵ درصد)؛ در حالی که ژنوتیپ ۱۱ کمترین فراوانی را دارد (۵ درصد). همچنین بیشترین فراوانی ژنوتیپی پاپیلوما در سرطان کارسینوما داکتال مهاجم وجود دارد که تیپ ۱۶ شایع‌ترین ژنوتیپ است.

فراوانی ژنوتیپ‌های ویروس پاپیلوما بر اساس درجه‌ی سرطان پستان

بافت‌های سرطانی بر اساس پیشرفت بیماری به سه درجه تقسیم شدند. جزییات فراوانی پاپیلوماویروس‌ها بر اساس درجه‌ی پاتولوژی در جدول ۲ آمده است. ویروس پاپیلوما در بافت‌های درجه‌ی III با ۴۱/۳ درصد، بیشترین فراوانی را داشت؛ در حالی که این ویروس در بافت‌های سرطانی درجه‌ی II کمتر یافت شد.

بحث

سرطان پستان بدخیمی شایع و یکی از عوامل اصلی مرگ زنان در جهان می‌باشد (۲). با توجه به داده‌های آماری ارایه شده توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO یا World health organization) در سال ۲۰۰۸ میلادی، سالانه حدود یک میلیون و صد و پنجاه هزار مورد جدید سرطان پستان از سرتاسر جهان گزارش می‌شود (۱).



شکل ۱. باند حاصل از فراورده‌ی Polymerase chain reaction (PCR) پرایمرهای GP۵+/۶ (سمت راست) و MY۰۹/MY۱۱ (سمت چپ)

جدول ۱. فراوانی ویروس پاپیلومای انسانی بر اساس نوع بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی سرطان پستان

نوع هیستوپاتولوژی	منفی تعداد (درصد)	HPV انواع دیگر تعداد (درصد)	HPV ۱۱ تعداد (درصد)	HPV ۶ تعداد (درصد)	HPV ۱۸ تعداد (درصد)	HPV ۱۶ تعداد (درصد)	کل
IDC	۵۳ (۷۹/۱)	۲ (۲/۹)	۱ (۱/۴)	۳ (۴/۴)	۳ (۴/۴)	۵ (۷/۴)	۶۷
ILC	۹ (۶۴/۲)	۱ (۷/۱)	۰	۱ (۷/۱)	۱ (۷/۱)	۲ (۱۴/۲)	۱۴
IMC	۵ (۸۳/۳)	۱ (۱۶/۶)	۰	۰	۰	۰	۶

HPV: Human papillomavirus; IDC: Invasive ductal carcinoma; ILC: Invasive lubolar carcinoma
IMC: Invasive medullary carcinom

جدول ۲. فراوانی ویروس پاپیلومای انسانی بر اساس درجه‌ی پاتولوژی

Grade IDC	HPV منفی تعداد (درصد)	HPV مثبت تعداد (درصد)	کل تعداد (درصد)
Grade I	۲۱ (۷۲/۵)	۸ (۲۷/۵)	۲۹ (۳۳/۳)
Grade II	۱۶ (۷۲/۸)	۶ (۲۷/۲)	۲۲ (۲۵/۲)
Grade III	۳۰ (۸۳/۳)	۶ (۱۶/۷)	۳۶ (۴۱/۳)
کل	۶۷ (۷۷/۱)	۲۰ (۲۲/۹)	۸۷

HPV: Human papillomavirus;
IDC: Invasive ductal carcinoma

بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اندکه سابقه‌ی ارثی سرطان پستان در خانواده، در ارتباط با عوامل خطر پیش زمینه‌ای همانند متغیرهای زاد و ولدی می‌باشد (۴). مشاهده‌ی افزایش خطر در ابتلا به سرطان پستان در زنان متعلق به خانواده‌هایی که سرطان پستان در آن‌ها سابقه دارد، به طبقه‌بندی این سرطان به عنوان موارد ارثی (خانوادگی) و تک گیر منجر شد (۷، ۴). گزارش‌های مختلف نشان داده‌اندکه زمینه‌های ارثی مسؤول ۱۰-۴ درصد کارسینوماهای پستان می‌باشند و تا حدودی موتاسیون در ژن‌های P۵۳، BRCA-۲ و BRCA-۱ در ارتباط با ایجاد سرطان پستان هستند (۱۵-۱۴).

اگر چه تخمین زده می‌شود که ویروس‌های سرطان‌زا عامل حدود ۲۰ درصد سرطان‌ها در انسان می‌باشند، اما همچنان ارتباط ویروس‌ها با سرطان پستان مورد بحث و تبادل نظر است (۱۶).

اثبات ارتباط یک ویروس با سرطان پستان در انسان، دهه‌ها است که محققین را مجذوب خود کرده است. کشف ردپای ویروس‌های اپشتین بار (virusEpstein-Barr)، HHV-۸ و HSV-۱ در سرطان پستان بر جذابیت این موضوع افزوده است (۱۹-۱۷).

ضمن این که رتروویروس‌ها نیز به عنوان عوامل احتمالی تکامل سرطان پستان در پستانداران شناخته شده‌اند (۲۰).

ارتباط سببی بین پاپیلوماویروس انسانی و سرطان پستان برای اولین بار با تشخیص ژنوم HPV-۱۶ در ۲۹/۴ درصد از نمونه‌های سرطان پستان در سال ۱۹۹۲ مطرح شد (۲۲-۲۱). در مطالعه‌ای مشابه که در کشور ژاپن انجام شد، در ۱۱/۱ درصد بافت‌های سرطانی پستان، ژنوم پاپیلوماویروس‌ها ردیابی شد (۲۱). همچنین یک مطالعه درکشور برزیل نشان داده است که تیپ‌های ۱۸ و ۱۶ پاپیلوماویروس در ۱۰ درصد از موارد سرطان پستان حضور دارند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر در کشور استرالیا، حضور تیپ‌های ۱۶، ۱۸ و ۳۳ ویروس پاپیلوما در بیش از ۶۰ درصد موارد سرطان پستان گزارش شد (۲۴).

به طور کلی، مطالعات فراوان در زمینه‌ی ارتباط پاپیلوماویروس با سرطان پستان، نتایج متغیر و گاه متناقض را در محدوده‌ی ۸۶-۴ درصد گزارش کرده‌اند (۱۱-۱۰). به نظر می‌رسد علت اصلی این تناقضات، محدودیت تکنیک‌های تشخیصی وتوزیع متفاوت اپیدمیولوژیکی پاپیلوماویروس در مناطق مختلف باشد.

در ایران دو گزارش از حضور پاپیلومای انسانی در بافت پستان ثبت شده است. در مطالعه‌ی طهماسبی فرد و همکاران، تنها در ۳ مورد از نمونه های بافت طبیعی فیبروستیک، ژنوم HPV یافت شد؛ اما در هیچ یک از نمونه‌های بافت سرطان پستان، ژنوم ویروس ردیابی نشده است (۲۵). این در حالی است که در مطالعه ی حاضر، در ۲۲/۹ درصد موارد سرطانی، حضور ویروس پاپیلوما تشخیص داده شد،

اما نمونه های فیبروستیک فاقد ژنوم HPV بودند. دومین مطالعه در ایران توسط سیگارودی و همکاران انجام شد که در ۲۵ درصد نمونه های بافت تومور پستان، ژنوم ویروس HPV از تیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۵، ۱۶ و ۱۸ ردیابی شد و یک نمونه‌ی شاهد غیر سرطانی هم دارای ژنوم ویروس پاپیلوما بود (۲۶).

یافته های حاصل از تحقیق حاضر، به نتایج این پژوهش نزدیک بود. ضمن این که در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد غیر سرطانی، ژنوم پاپیلوماویروس ردیابی نشد. لازم به ذکر است که در تحقیق سیگارودی و همکاران (۲۶) تیپ‌های۱۶ و ۱۸ غالب بودند، اما در مطالعه‌ی حاضر تیپ ۶ شایع‌تر بود.

در مطالعات گذشته، حضور تیپ‌های پرخطر HPV-۱۸، HPV-۱۶ و HPV-۳۳ در نمونه‌های سرطان پستان از جمعیت‌های مختلف در کشورهای ایتالیا، چین، ژاپن، آمریکا، اتریش، برزیل، استرالیا، تایوان، ترکیه، کره و سوریه به اثبات رسیده است (۲۲-۲۱). نتایج پژوهش حاضر که بر روی نمونه‌های بافت سرطانی شهر یزد صورت گرفته است، مؤید توزیع اپیدمیولوژیکی پاپیلوماویروس به ویژه تیپ پرخطر ۱۶ و نقش آن در سرطان پستان در این منطقه از کشور ایران است.

Hennig و همکاران حضور HPV-۱۶ را در ۴۶ درصد از سرطان های پستان با هیستوپاتولوژی IDC (Invasive ductal carcinoma) و ILC (Invasive lubolar carcinoma) در زنان با سابقه‌ی ضایعات نئوپلازی Cervical intraepithelial neoplasia (CINIII) تأیید کرده‌اند (۲۷). اطلاعات حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تمامی ایزوله های شناسایی شده مربوط به ۲ نوع هیستوپاتولوژی IDC و ILC بودند و ۲۲/۹ درصد موارد بافت سرطانی به ویروس پاپیلومای انسانی آلوده بودند.

نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن است که عفونت HPV با پیشرفت سرطان (درجه و شدت بیماری) ارتباط معنی داری ندارد که البته با نتایج مطالعه‌ی سیگارودی و همکاران (۲۶) در ایران در تضاد است (۲۷).

لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر، تیپ‌های پوستی پاپیلوماویروس ارزیابی نشدند؛ در حالی که تیپ‌های ۱۵ و ۲۳ ویروس پاپیلومای انسانی در مطالعات سیگارودی و همکاران (۲۶) و de Villiers و همکاران (۲۸) شناسایی شده‌اند. این مسأله ناشی از توزیع اپیدمیولوژیکی متفاوت ویروس، حتی در یک کشور می‌باشد. de Cremoux و همکاران با بررسی ۵۰ بافت سرطانی پستان، هیچ کدام از تیپ های ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ را نیافتند. بنابراین تشخیص این تیپ‌ها در مطالعه‌ی حاضر مؤید وجود عوامل مختلف اپیدمیولوژیکی در کشورهای مختلف است (۱۲).

همچنین بر خلاف نتایج پژوهش حاضر، Lindel و همکاران قادر به شناسایی HPV در نمونه‌های بافت سرطان پستان در زنان سوئیسی نبودند که نشان دهنده ی الگوی اپیدمیولوژی متفاوت این ویروس در مناطق مختلف جهان است (۲۹).

Yasmeen و همکاران نشان دادند که ژنوم HPV در بسیاری از سرطان‌های تهاجمی و متاستاتیک پستان حضور دارد؛ در صورتی که در سرطان In situ medullary carcinoma کمتر یافت می‌شود. در مطالعه ی حاضر نیز این یافته وجود داشت و بافت سرطانی Medullary in situ از نظر وجود ویروس پاپیلومای انسانی منفی بود. همین طور مشاهده شد که

اکثر ایزوله‌های ویروسی، مربوط به موارد پاتولوژی تهاجمی می‌باشند که مطابق با نتایج مطالعه‌ی Yasmeen و همکاران است (۳۰).

در پایان، جهت وضوح بیشتر نقش عوامل متعدد ویروسی به عنوان یکی از عوامل محیطی مؤثر در پاتوژنز سرطان پستان، انجام بررسی‌های متعدد در این زمینه، در سراسر ایران پیشنهاد می‌شود.

اگر چه تفاوت‌های زیادی در شیوع ویروس پاپیلومای انسانی در سرطان پستان در سراسر دنیا وجود دارد، اما اکثر ایزوله‌های شناسایی شده، از تیپ‌های پرخطر می‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر نیز بیش از نیمی (۵۵ درصد) از ایزوله‌های شناسایی شده تیپ پرخطر هستند که مطابق با سایر مطالعات است. احتمال می‌رود عفونت پاپیلوماویروس باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان شهر یزد گردد.

چنانچه احتمال این ارتباط با انجام مطالعات بیشتر روشن گردد، اتخاذ راهکارهای درمانی ضد ویروسی و پیشگیری سطح اول، یعنی واکسیناسیون، جهت جلوگیری از بروز روزافزون این سرطان، می‌تواند بسیار سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل نتایج بخشی از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی پزشکی است که در مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به انجام رسیده است. بدین وسیله از زحمات ریاست و همه‌ی همکاران محترم بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های ویروسی دام مؤسسه‌ی رازی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010; 127(12): 2893-917.
2. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer 2006; 118(12): 3030-44.
3. Lacey JV, Devesa SS, Brinton LA. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. Environ Mol Mutagen 2002; 39(2-3): 82-8.
4. Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. Int J Cancer 2002; 99(2): 260-6.
5. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, et al. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. Br J Cancer 2000; 83(5): 561-5.
6. Zangen D. Autodisplay von enzyminhibitoren [Thesis]. Homburg, Germany: Saarland University 2002.
7. McGrath M, Wong JY, Michaud D, Hunter DJ, De Vivo I. Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16(4): 815-9.
8. Helt AM, Funk JO, Galloway DA. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. J Virol 2002; 76(20): 10559-68.
9. Band V, Delmolino L, Androphy EJ. Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells. EMBO J 1993; 12(5): 1847-52.
10. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002; 2(5): 342-50.
11. Mendizabal-Ruiz AP, Morales JA, Ramirez-Jirano LJ, Padilla-Rosas M, Moran-Moguel MC, Montoya-Fuentes H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. Breast Cancer Res Treat 2009; 114(1): 189-94.

12. de Cremoux P, de la Rochefordiere A, Savignoni A, Kirova Y, Alran S, Fourchotte V, et al. Different outcome of invasive cervical cancer associated with high-risk versus intermediate-risk HPV genotype. Int J Cancer 2009; 124(4): 778-82.
13. Sanner K, Wikstrom I, Strand A, Lindell M, Wilander E. Self-sampling of the vaginal fluid at home combined with high-risk HPV testing. Br J Cancer 2009; 101(5): 871-4.
14. He C, Tamimi RM, Hankinson SE, Hunter DJ, Han J. A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat 2009; 113(3): 585-94.
15. Rahman N, Scott RH. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. Hum Mol Genet 2007; 16(1): R60-R66.
16. Dimmock N, Easton A, Leppard K. Introduction to modern virology. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2009.
17. Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. Cancer Res 1995; 55(1): 39-45.
18. Newton R, Ziegler J, Bourboulia D, Casabonne D, Beral V, Mbidde E, et al. The sero-epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in adults with cancer in Uganda. Int J Cancer 2003; 103(2): 226-32.
19. Tsai JH, Tsai CH, Cheng MH, Lin SJ, Xu FL, Yang CC. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. J Med Virol 2005; 75(2): 276-81.
20. Lawson JS, Tran D, Rawlinson WD. From Bittner to Barr: a viral, diet and hormone breast cancer aetiology hypothesis. Breast Cancer Res 2001; 3(2): 81-5.
21. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, et al. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. Anticancer Res 1999; 19(6B): 5057-61.
22. Lonardo AD, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment 1992; 21(2): 95-100.
23. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 2004; 84(2): 131-7.
24. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. Br J Cancer 2005; 93(8): 946-8.
25. Tahmasebi Fard Z, Abdirad A, Saatian M, Arefian L. Association between human Papillomavirus (HPV) and Breast cancer in Iranian patients. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch 2013; 23(2): 120-6. [In Persian].
26. Sigaroodi A, Nadji SA, Naghshvar F, Nategh R, Emami H, Velayati AA. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran. ScientificWorld Journal 2012; 2012: 837191.
27. Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). Breast Cancer Res Treat 1999; 53(2): 121-35.
28. de Villiers EM, Sandstrom RE, zur HH, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. Breast Cancer Res 2005; 7(1): R1-11.
29. Lindel K, Forster A, Altermatt HJ, Greiner R, Gruber G. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. Breast 2007; 16(2): 172-7.
30. Yasmeen A, Bismar TA, Kandouz M, Foulkes WD, Desprez PY, Al Moustafa AE. E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. Cell Cycle 2007; 6(16): 2038-42.

Journal of Isfahan Medical School Received: 19.01.2014

Vol. 32, No. 279, 4th Week, May 2014 Accepted: 16.04.2014

The Relationship of Low-Risk (6, 11) and High-Risk Types (16, 18) of Papilloma Virus and Human Breast Cancer in Women

Masoud Doosti[1], Mehran Bakhshesh PhD[2], Shokouh Taghipour-Zahir PhD[3], Alirza Hatami[2], Mohammad Shayestehpour[4], Mansour Moghimi PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Human papilloma virus (HPV) is one of the effective factors in the occurrence and development of cervical and breast cancers. This study aimed to investigate the relationship of low-risk (6, 11) and high-risk types (16, 18) of papilloma virus and human breast cancer in women.

Methods: In this case-control study, the breast tissues of 87 cases of breast cancer and 84 women without malignant diseases (fibrocystic) in Shahid Sadoghi hospital, Yazd city, Iran were selected. To determine the low- and high-risk types of HPV, firstly the nested polymerase chain reaction (PCR) method, and then, the PCR method with specific primers were used.

Findings: HPV genome was detected in 22.9% of the samples that 18.3% of cases were containing mucosal genotypes (11, 16, 18 and 6). HPV-16 was the most common genotype in invasive ductal carcinoma. In general, genotype 16 was the most abundant type associated with breast cancer (35%) and type 11 had the lowest correlation with breast cancer (5%).

Conclusion: In this study, the possible association between human papilloma virus infection (especially type 16) and the occurrence and development of breast cancer was confirmed in women of Yazd city. The frequencies of genotypes were not significantly associated with the type of breast cancer tissue.

Keywords: Breast cancer, Genotype, Human papilloma virus, Polymerase chain reaction (PCR)

Citation: Doosti M, Bakhshesh M, Taghipour-Zahir Sh, Hatami A, Shayesteh pour M, Moghimi M. **The Relationship of Low-Risk (6, 11) and High-Risk Types (16, 18) of Papilloma Virus and Human Breast Cancer in Women.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(279): 368-77

1- MSc Student, Department of Investigations and Diagnosis of Viral Diseases of Livestock, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of Investigations and Diagnosis of Viral Diseases of Livestock, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4- PhD Student, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Corresponding Author: Mehran Bakhshesh PhD, Email: m.bakhshesh@ac.ir

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۹/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۳۱

مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن بهینه شده‌ی زیر واحد B کلرا توکسین به عنوان کاندید واکسن

دکتر شهرام نظریان[۱]، محمدعلی عارف‌پور[۲]، محمدجواد باقری‌پور[۳]، دکتر غلامرضا اولاد[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: وبا بیماری خطرناکی است که توسط باکتری ویبریوکلرا ایجاد می‌شود. توکسین کلرا مهم‌ترین عامل ویرولانس در بیماری‌زایی ویبریو کلرا می‌باشد. زیر واحد B انتروتوکسین (CtxB یا Cholera toxin subunit B) که مسؤول اتصال سم به سلول یوکاریوتی است، ویژگی‌های ایمونوژنیک دارد. هدف از این تحقیق، بررسی بیوانفورماتیکی و تولید پروتئین نوترکیب (CtxB) بود.

روش‌ها: ژن CtxB به لحاظ وجود کدون‌های نادر مورد بررسی قرار گرفت و بهینه‌سازی ژن با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی انجام شد. پلاسمید نوترکیب pET۲۸a/CtxB به سلول‌های E. coli BL۲۱ DE۳ (Escherichia coli) منتقل و بیان پروتئین با استفاده از IPTG (Isopropyl β-D-۱-thiogalactopyranoside) القا گردید. بیان پروتئین با روش‌های Western blotting و SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamide gel electrophoresis) ارزیابی شد. پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic acid) تخلیص گردید.

یافته‌ها: شاخص سازگاری کدون (CAI یا Codon adaptation index) مربوط به ژن طبیعی ۰/۶۱ بود؛ در حالی که ژن بهینه‌سازی شده شاخص ۰/۹۲ را داشت. درصد کدون‌های با شیوع بالا در ژن به ۶۷ درصد بهبود یافت. آنالیز آنزیمی صحت همسانه‌سازی ژن CtxB در وکتور pET۲۸a/CtxB را تأیید کرد. Western blotting واکنش اختصاصی پروتئین نوترکیب با آنتی بادی ضد توکسین کلرا را نشان داد. میزان پروتئین خالص شده برای هر لیتر از محیط، ۹ میلی‌گرم بود.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی ژن *CtxB* روش مناسب برای بیان بالای پروتئین نوترکیب می‌باشد. این پروتئین را می‌توان به صورت کپسوله شده به منظور ایمنی‌زایی خوراکی تولید کرد.

واژگان کلیدی: کلرا توکسین، زیر واحد B کلرا توکسین، بهینه‌سازی ژن، پروتئین نوترکیب

ارجاع: نظریان شهرام، عارف‌پور محمدعلی، باقری‌پور محمدجواد، اولاد غلامرضا. **مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و بررسی بیان ژن بهینه شده‌ی زیر واحد B کلرا توکسین به عنوان کاندید واکسن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۹): ۳۸۷-۳۷۸

۱- مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
۴- پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهرام نظریان
Email: nazarian56@gmail.com

مقدمه

گونه‌های ویبریو جزء شایع‌ترین ارگانیسم‌های موجود در آب می‌باشند. در این میان، ویبریو کلرا عامل بیماری مهلک وبا است که اغلب کشورهای جهان سوم را درگیر می‌نماید و با مرگ و میر بالایی نیز همراه است (۲-۱). بیماری وبا توسط سویه‌هایی از ویبریو کلرای تولید کننده‌ی توکسین وبا ایجاد می‌شود. عملکرد توکسین منجر به از دست دادن سریع آب و الکترولیت‌ها و در نتیجه کاهش شدید حجم پلاسمای خون و در نهایت کلاپس عروق و مرگ در عرض چند ساعت خواهد شد (۴-۳). ویبریو کلرا، دارای عوامل بیماری‌زایی متعددی از جمله آنزیم‌ها و سموم مختلف می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها کلرا توکسین است که یک اگزوتوکسین و عامل اصلی بیماری وبا می‌باشد (۶-۵).

کلرا توکسین (Ctx یا Cholera toxin) خواص آنتی ژنیک قابل توجهی از خود نشان می‌دهد؛ به طوری که توجه محققین را برای ایجاد مصونیت در برابر این بیماری به خود معطوف داشته است (۸-۷). این توکسین، پروتئین اولیگومری متشکل از زیر واحدهای هترودایمر A (CtxA) با وزن مولکولی ۲۷۴۰۰ دالتون و زیر واحدهای هوموپنتامر B (CtxB) با وزن مولکولی حدود ۵۸۰۰۰ دالتون می‌باشد. زیر واحد B شامل ۵ قسمت ۱۰۳ اسید آمینه‌ای است که آرایش حلقه مانند دارد و دارای محل اتصال به GM۱ سلول‌های اپی‌تلیال ژژنوم است (۹). زیر واحد A به صورت پروتئولیتیکی برش خورده و دو زنجیره‌ی پلی پپتیدی به نام‌های A۱ و A۲ ایجاد می‌نماید. به نظر می‌رسد زیر واحد A۱ مسؤول کلیه‌ی فعل و انفعالات بیولوژیکی کلرا توکسین باشد (۱۰، ۳).

زیر واحد B خاصیت سمی ندارد و مسؤول اتصال سم به گیرنده‌های موجود در غشای سیتوپلاسمی سلول میزبان است. این بخش، زیر واحد A۱ را قادر می‌سازد تا درون سلول نفوذ کند. عملکرد زیر واحد A۱ باعث افزایش آدنیلات سیکلاز و افزایش مداوم آدنوزین مونو فسفات حلقوی (Cyclic adenosine monophosphate یا cAMP) داخل سلولی می‌گردد که در نهایت، ترشح بیش از حد آب و الکترولیت در روده را سبب می‌شود (۹، ۴).

در سال‌های اخیر، خواص ایمونولوژیکی Ctx بسیار مورد توجه بوده است، اما سمیت Ctx موجب محدود شدن استفاده‌ی آن برای واکسیناسیون انسانی شده است. در عوض استفاده از CtxB به علت نداشتن عوارض جانبی، به طور وسیعی به عنوان ایمونوژن مخاطی در انسان مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲-۱۱، ۸). از این رو، تولید پروتئین نوترکیب CtxB می‌تواند کاربردهای فراوانی در تهیه‌ی واکسن‌های خوراکی داشته باشد (۱۴-۱۳). روش‌های قدیمی تخلیص CtxB بر پایه‌ی کشت انبوه باکتری ویبریو کلرا و سپس جمع‌آوری محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته و در نهایت، استخراج سم از آن بود. در این روش‌ها، علاوه بر این که امکان جداسازی CtxB به صورت خالص وجود نداشت، پروتئین به دست‌آمده حاوی مقادیری CtxA و سایر پروتئین‌های ناخواسته بود که موجب محدودیت استفاده از آن می‌شد (۱۵).

در روش تولید پروتئین نوترکیب، علاوه بر کاهش خطرات ناشی از کار با عامل بیماری، پروتئین به دست آمده، خالص است و در ضمن، تولید آن مقرون به صرفه می‌باشد؛ به طوری که می‌توان در مدت زمان

و با هزینه‌ی کمتر، میزان پروتئین خالص بیشتری تولید نمود (۱۵). با توجه به خاصیت ادجوانی (adjuvant) زیر واحد اتصالی سم و امکان استفاده از آن به عنوان کاندید واکسن، در این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیکی و بهینه‌سازی ژن کد کننده‌ی CtxB جهت بیان پروتئین ناحیه‌ی اتصال دهنده‌ی کلرا توکسین با استفاده از باکتری E. coli (Escherichia coli) مد نظر قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه از باکتری E. coli BL۲۱ DE۳ استفاده شد. همچنین از محیط‌های کشت لوریا برتونی مایع (Luria-Bertani یا LB Broth) و آگار جهت رشد باکتری E. coli استفاده گردید. جهت انتخابی نمودن رشد باکتری نیز از آنتی‌بیوتیک کانامایسین شرکت فرمنتاز استفاده شد. به منظور تأیید همسانه‌سازی ژن در وکتور بیانی، از آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII ساخت شرکت فرمنتاز استفاده گردید.

مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت‌های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمنتاز تهیه شد. همچنین برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل- نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA یا Nickel-Nitrilotriacetic acid) از شرکت کیاژن استفاده شد.

برای انجام مطالعه، ابتدا ترادف ژن زیر واحد اتصال دهنده کلراتوکسین از بانک ژن (NCBI یا National center for biotechnology information) استخراج گردید. به منظور بهینه‌سازی کدون‌های ژن CtxB طبیعی و تبدیل آن به کدون‌های رایج E. coli، آنالیزهای بیوانفورماتیکی لازم با استفاده از نرم‌افزارهای تحت شبکه و نرم‌افزار DNAsis به منظور بررسی محتوای GC این ژن، وجود کدون‌های نادر، پایداری mRNA (Messenger RNA) و نیز شاخص سازگاری کدون (CAI یا Codon adaptation index) انجام گرفت. با استفاده از الگوریتم OptimumGene™ و نرم افزار OPTIMIZER کلیه‌ی پارامترهای ذکر شده به منظور رسیدن به بیان حداکثر در باکتری E. coli مطابق با الگوی کدون‌های رایج این باکتری بهینه‌سازی شد (۱۶-۱۷).

پایداری mRNA ژن بهینه‌سازی شده با استفاده از نرم‌افزار Mfold انجام شد (۱۸). توالی مورد نظر، بعد از بررسی شباهت با توالی آمینو اسیدی، توسط نرم‌افزار وب کاتر مورد آنالیز قرار گرفت و از میان آنزیم‌هایی که فاقد جایگاه برش در توالی بهینه‌سازی شده بودند، دو آنزیم EcoRI و HindIII انتخاب شدند. شباهت توالی بهینه‌سازی شده با توالی اولیه‌ی پروتئین CtxB با نرم‌افزار BLASTx (Basic local alignment search tool) مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت، برای ساخت به شرکت Shingene چین ارسال شد. سازه‌ی ژنی دارای توالی EcoRI در ابتدا و توالی HindIII در انتها بر روی وکتور pEt۲۸a سنتز و به صورت لئوفیلیزه دریافت شد.

پس از دریافت ژن، با استفاده از سلول‌های مستعد E. coli LB۲۱ DE۳ و روش شوک حرارتی، تراریخت صورت گرفت. از میان کلونهای به دست‌آمده در محیط LB آگار حاوی ۸۰ µg/ml کانامایسین، ۱۰ کلنی انتخاب و به طور جداگانه در محیط LB مایع حاوی ۸۰ µg/ml کانامایسین به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای

۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm کشت داده شدند. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، با روش لیز قلیایی، پلاسمید استخراج گردید. با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII بر روی پلاسمیدهای استخراج شده، هضم آنزیمی صورت گرفت و وجود ژن CtxB در کنار نشانگر مولکولی توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد ارزیابی شد.

جهت بیان پروتئین نوترکیب، کلونی‌های تأیید شده در محیط LB مایع حاوی ۸۰ µg/ml کانامایسین تلقیح و به مدت یک شب در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از کشت مجدد، زمانی که جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۶ رسید، با افزودن ماده‌ی القا کننده‌ی IPTG (Isopropyl β-D-۱-thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار در شرایط استریل، القا صورت گرفت. محیط‌های پیش‌گفته در Shaker انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از گذشت ۵ ساعت، سلول‌های محیط با سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. سلول‌ها با بافر لیز کننده شکسته و به همراه نشانگر پروتئینی، روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamide gel electrophoresis) الکتروفورز گردیدند. بررسی صحت پروتئین نوترکیب بیان شده با روش ایمونوبلاتینگ و استفاده از آنتی‌بادی ضد کلرا توکسین (Anti-CTX) انجام شد (۱۹).

برای تخلیص پروتئین، از ستون نیکل- نیتریلو استیک اسید ساخت شرکت کیاژن استفاده شد. با توجه به این که پروتئین نوترکیب به دست آمده به صورت نامحلول و اجسام انکلوژنی بود، از بافرهای حاوی اوره‌ی ۸ مولار برای شستشوی ستون با شرایط دناتوره استفاده شد. پس از تخلیص پروتئین، حذف اوره به روش شیب دیالیز انجام گرفت.

یافته‌ها

توالی ژن CtxB از لحاظ وجود کدون‌های نادر و همچنین میزان نوکلئوتیدهای C و G مورد ارزیابی قرار گرفت. برای افزایش میزان بیان پروتئین نوترکیب، توالی ژن مورد نظر بهینه‌سازی شد. محتوای GC و درصد توزیع کدون‌های ژن CtxB قبل و بعد از فرایند بهینه‌سازی در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان GC این ژن از ۳۶/۴۰ (در حالت طبیعی) به مقدار ۴۹/۹۰ بعد از بهینه‌سازی افزایش یافته است و در نتیجه‌ی آن، میزان AT از ۶۳/۶۰ در حالت طبیعی به مقدار ۵۰/۱۰ در حالت بهینه‌سازی شده، کاهش یافته است. همچنین شکل ۳، شاخص سازگاری کدون ژن CtxB قبل و بعد از بهینه‌سازی را نشان می‌دهد که از ۰/۶۱ به ۰/۹۲ بعد از بهینه‌سازی رسیده است.

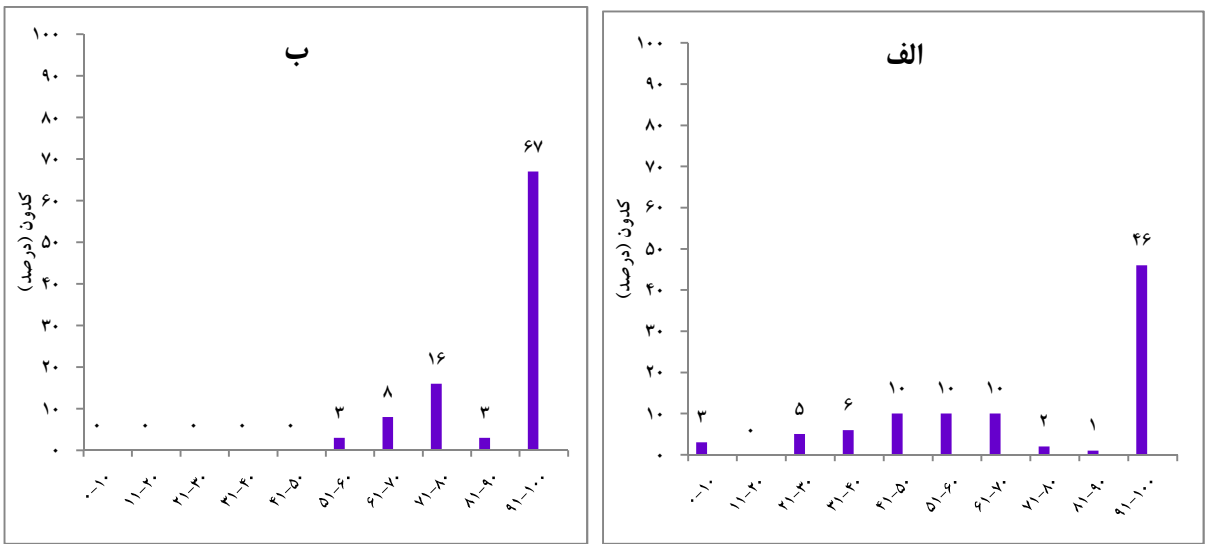
نتایج حاصل از جستجوی توالی نوکلئوتیدی در بانک‌های اطلاعاتی پروتئینی BLASTx نشان داد که این توالی به صورت کامل و ۱۰۰ درصد با توالی پروتئین طبیعی همولوژی دارد.

ساختار ثانویه‌ی mRNA پس از بهینه‌سازی کدون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۴). میزان حداقل انرژی ساختار mRNA نیز ۷۶/۰۶- کیلوکالری بر مول بود. همچنین، ساختارهای نامناسب که بر فرایند ترجمه‌ی پروتئین مؤثر هستند، نیز دیده نشد.

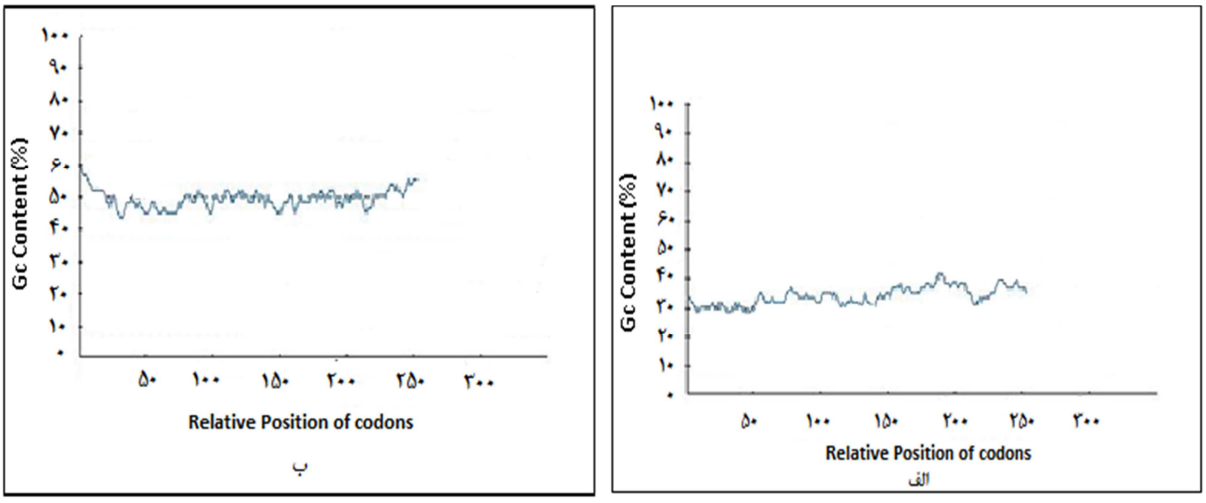
استخراج پلاسمید از باکتری E. coli با روش لیز قلیایی انجام و روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. بررسی صحت پلاسمید حاوی ژن با روش هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII انجام گرفت و صحت سازه‌ی ژنی تأیید شد (شکل ۵).

نتایج بررسی بیان ژن مورد مطالعه (pET۲۸a/CtxB) با استفاده از بررسی کل محتوای پروتئینی سلول‌های بیانی جمع‌آوری شده بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE، مورد تأیید قرار گرفت. در نمونه‌های القا شده، پروتئین با بیان بسیار بالا مشاهده شد؛ در حالی که در نمونه‌های القا نشده، پروتئین CtxB وجود نداشت (شکل ۶).

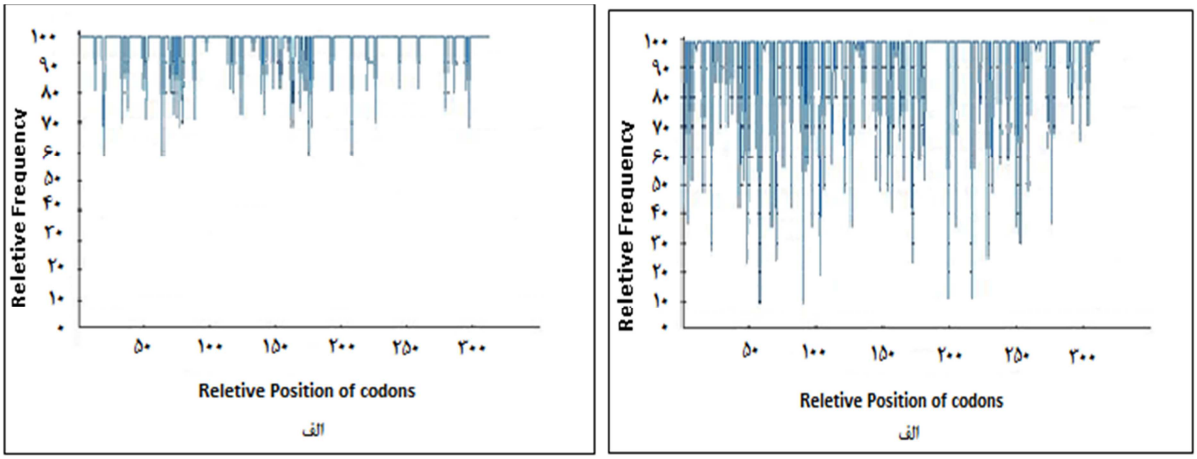
بررسی حلالیت پروتئین نشان داد که پروتئین به صورت اجسام انکلوژنی در سیتوپلاسم تجمع پیدا می‌کند.



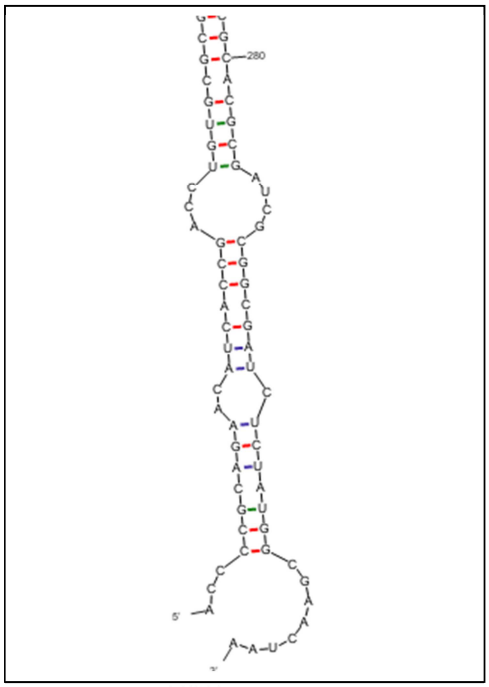
شکل ۱. درصد توزیع کدون‌های مربوط به ژن طبیعی CtxB (الف) و ژن بهینه‌سازی شده‌ی CtxB (ب)
به کدون‌هایی که بالاترین فراوانی را دارند، ارزش ۱۰۰ داده شده است.



شکل ۲. متوسط درصد بازهای GC مربوط به ژن طبیعی CtxB (الف) و ژن بهینه‌سازی شده‌ی CtxB (ب)



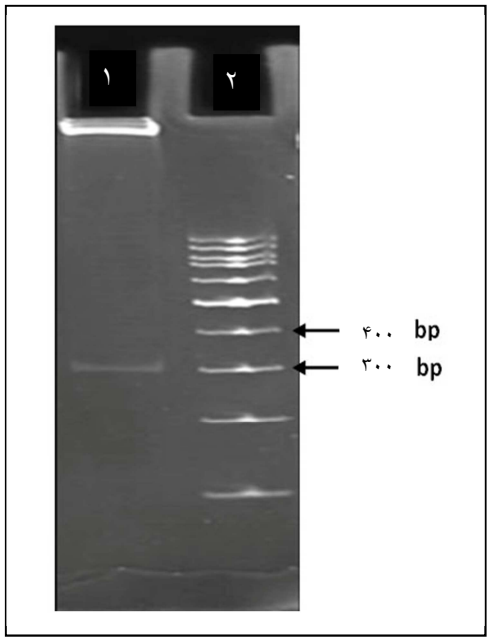
شکل ۳. شاخص سازگاری کدون (CAI یا Codon adaptation index) مربوط به ژن طبیعی CtxB (الف) و ژن بهینه‌سازی شده‌ی CtxB (ب)



شکل ۴. پیش‌بینی ساختار ثانویه‌ی mRNA پس از بهینه‌سازی کدون‌های ژن CtxB

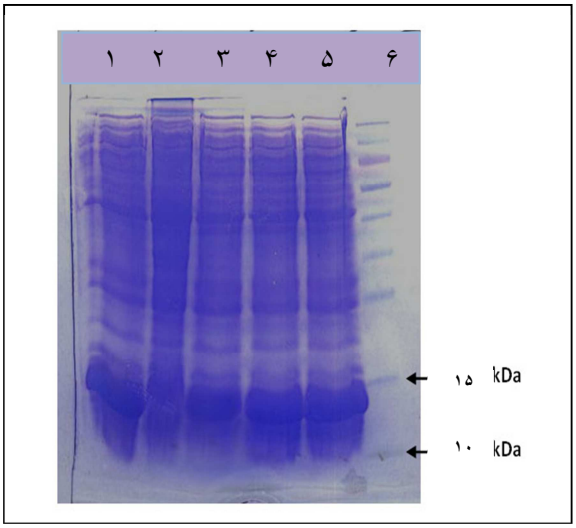
ساختار ناحیه‌ی شروع ۵' mRNA نشان داده شده است.

نتایج حاصل از تکنیک ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی Anti-CTX، پروتئین نوترکیب حاصل از بیان ژن CtxB را در مقایسه با شاهد، به خوبی تأیید نمود (شکل ۷). نتایج حاصل از تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل- نیتریلو استیک اسید، بیانگر وجود پروتئین نوترکیب در نمونه‌ی جمع‌آوری شده از مرحله‌ی آخر شستشو با درجه‌ی خلوص بالا بود (شکل ۸).



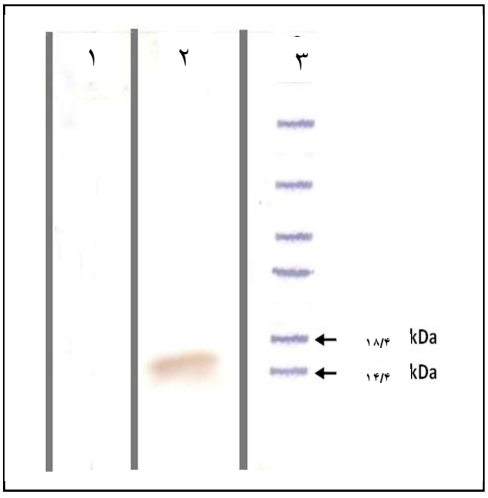
شکل ۵. تأیید همسانه‌سازی ژن CtxB در پلاسمید pET۲۸a به روش هضم آنزیمی

ستون ۱) هضم آنزیمی پلاسمیده‌ی تخلیص شده، ستون ۲) نشانگر اندازه‌ی DNA (DNA Ladder ۱۰۰ bp فرمتاز)



شکل ۶. بررسی بیان پروتئین CtxB بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو

ستون ۱، ۳، ۴، ۵ نمونه‌های بعد از القا، ستون ۲ نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۶ نشانگر اندازه‌ی پروتئین (SM۰۶۷۱ فرمنتاز)

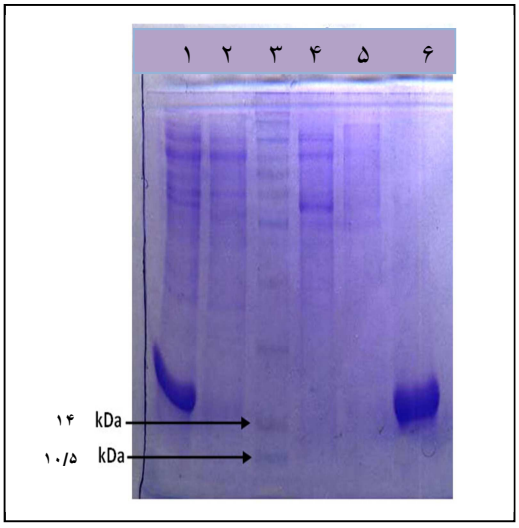


شکل ۷. تأیید پروتئین نوترکیب به روش Western blotting با استفاده از Anit-CTX

ستون ۱ نمونه‌ی قبل از القا، ستون ۲ نمونه‌ی بعد از القا، ستون ۳ نشانگر اندازه‌ی پروتئین (SM۰۴۳۱ فرمنتاز).

بحث

ژن CtxB بعد از طراحی و انجام بررسی‌های بیوانفورماتیکی و سنتز، به باکتری BL۲۱ DE۳ E.coli منتقل شد. تمامی نتایج از جمله تعیین وزن



شکل ۸. بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS- PAGE ۱۲ درصد

ستون ۱ نمونه‌ی قبل از تخلیص، ستون ۲ نمونه‌ی خروجی قبل از شستشو، ستون ۴ و ۵ نمونه‌ی خروجی پس از شستشو با بافر C و D، ستون ۶ پروتئین تخلیصی شده با بافر استخراج E، ستون ۳ نشانگر اندازه‌ی پروتئین (PR۰۶۰۲۰ ویوانتیس).

مولکولی بیان شده و واکنش آن با Anti-CTX مؤید بیان زیر واحد B کلرا توکسین است. مطالعات مختلف نشان داده است که بر خلاف کلرا توکسین که دارای سمیت است و استفاده از آن به حیوان محدود شده است، CtxB دارای خاصیت ایمونوژنی و ادجوانی مخاطی می‌باشد (۱۵). Isaka و همکاران نشان دادند که زیر واحد بتای سم کلرا و تجویز آن از طریق بینی به همراه توکسوئید دیفتری عملکرد ادجوانی مناسبی را به همراه دارد (۲۰).

Kundu و همکاران زیر واحد بتا از سم و باکتری ویبریو کلرا O۱ را تکثیر و در وکتور pET-۱۴b زیر همسانه‌سازی و بیان کردند. نتایج تحقیقات نشان داده است که استفاده از CtxB علاوه بر عملکرد ادجوانی به تنهایی توانسته است تا ۷۰ درصد از فعالیت سم ممانعت کند (۲۱). در واقع، CtxB با اتصال به

آنتی‌ژن‌ها، موجب تحریک پاسخ ایمنی به واسطه‌ی برهمکنش آنتی‌ژن با سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (APC یا Antigen-presenting cell) موجود در مخاط گوارش و تنفس می‌شود. CtxB به صورت کوالان به آنتی‌ژن‌ها متصل می‌شود و آن‌ها را از طریق گانگلیوزید GM۱ به سلول‌های مخاطی حمل می‌کند و بدین ترتیب، خاصیت ادجوانی CtxB زمانی که به صورت کونژوگه همراه با سایر پروتئین‌ها باشد، تأیید شده است (۲۰، ۱۵).

از آن جا که تولید بالای پروتئین نوترکیب، یکی از نکات مهم در تهیه‌ی کاندیداهای واکسن می‌باشد، نتایج این تحقیق نشان داد که بهینه‌سازی ژن به منظور بالا بردن تولید پروتئین، راهکاری مناسب است. ضیغمی و همکاران در تحقیقی زیر واحد بتای سم کلرا را از طریق (Polymerase chain reaction) PCR تکثیر و پس از همسانه‌سازی در وکتور بیانی، به صورت نوترکیب تولید کردند (۲۲). میزان تخلیص پروتئین نوترکیب مورد نظر ۴۸۰ میکروگرم در لیتر گزارش شد که در مقایسه با میزان تخلیص پروتئین تولید شده در تحقیق حاضر (۹ میلی‌گرم در لیتر) بسیار کمتر می‌باشد. همچنین در تحقیق حاضر، بر خلاف روش ضیغمی و همکاران، از آنتی پروتئاز نیز استفاده نشده است.

Kundu و همکاران نیز این زیر واحد را در وکتور pET-۱۴b زیر همسانه‌سازی و بیان کرد؛ اما در مقاله‌ی آن‌ها اشاره‌ای به میزان تولید پروتئین در هر لیتر از محیط کشت نشده است (۲۱).

یکی از ویژگی‌های مهم زیر واحد بتای سم کلرا، تشابه بسیار زیاد آن با زیر واحد بتای سم حساس به حرارت اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک می‌باشد. از آن جا که این دو پروتئین دارای اپی‌توپهای مشترک می‌باشند (۲۳)، می‌توان در تحقیقات مربوط به ایمنی‌زایی علیه اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک از آنتی‌بادی تولید شده علیه CtxB نیز استفاده کرد.

با توجه به خواص ادجوانی و همچنین اهمیت این پروتئین در واکسن‌سازی، به نظر می‌رسد بیان این پروتئین به صورت نوترکیب، روش مناسب، کارا و مقرون به صرفه‌ای برای تولید این پروتئین و انجام مطالعات بعدی مانند اثرات ایمنی‌زایی آن به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ایمونوژن و همچنین به صورت‌های مختلف مانند خوراکی باشد

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی گروه و مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) در انجام این تحقیق، قدردانی می‌شود.

References

1. Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Rahgerdi AK. Rapid screening of toxigenic vibrio cholerae O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. Iran Biomed J 2008; 12(1): 15-21.
2. Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pac J Trop Med 2011; 4(7): 573-80.
3. Vanden Broeck D, Horvath C, De Wolf MJ. Vibrio cholerae: cholera toxin. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(10): 1771-5.
4. Hill DR, Ford L, Lalloo DG. Oral cholera vaccines: use in clinical practice. Lancet Infect Dis 2006; 6(6): 361-73.
5. Mousavi SL, Rasouli I, Nazarian SH, Amani J. Simultaneous detection of escherichia coli o157:h7, toxigenic vibrio cholerae, and salmonella typhimurium by multiplex pcr. Iran J Clin Infect Dis 2009; 4(2): 97-103. [In Persian].

6. Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. Indian J Med Res 2011; 133: 179-87.
7. Banerjee R, Das B, Balakrish NG, Basak S. Dynamics in genome evolution of Vibrio cholerae. Infect Genet Evol 2014; 23: 32-41.
8. Sanchez J, Holmgren J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. Cell Mol Life Sci 2008; 65(9): 1347-60.
9. Ahmadi S, Mousavi ML, Sorouri R, Salimian J, Karimi A, Nazarian SH, et al. Rapid detection of toxigenic vibrio cholera o1 using PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). Kowsar Medical Journal 2006; 11(1): 41-50. [In Persian].
10. De Haan L, Hirst TR. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). Mol Membr Biol 2004; 21(2): 77-92.
11. Fan JL, Peterson JW, Prabhakar BS. Adjuvant effects of cholera toxin b subunit on immune response to recombinant thyrotropin receptor in mice. J Autoimmun 2000; 14(1): 43-52.
12. Sun JB, Eriksson K, Li BL, Lindblad M, Azem J, Holmgren J. Vaccination with dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen conjugated to cholera toxin efficiently induces specific tumoricidal CD8+ cytotoxic lymphocytes dependent on cyclic AMP activation of dendritic cells. Clin Immunol 2004; 112(1): 35-44.
13. Tochikubo K, Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Matano K, Miura Y, et al. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. Vaccine 1998; 16(2-3): 150-5.
14. Kim HJ, Kim JK, Seo SB, Lee HJ, Kim HJ. Intranasal vaccination with peptides and cholera toxin subunit B as adjuvant to enhance mucosal and systemic immunity to respiratory syncytial virus. Arch Pharm Res 2007; 30(3): 366-71.
15. de Geus B, Dol-Bosman M, Scholten JW, Stok W, Bianchi A. A comparison of natural and recombinant cholera toxin B subunit as stimulatory factors in intranasal immunization. Vaccine 1997; 15(10): 1110-3.
16. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. Nucleic Acids Res 2007; 35(Web Server issue): W126-W131.
17. Nazarian S, Mousavi Gargari SL, Rasooli I, Amani J, Bagheri S, Alerasool M. An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. J Microbiol Methods 2012; 90(1): 36-45.
18. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 2003; 31(13): 3406-15.
19. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbiol Res 2014; 169(2-3): 205-12.
20. Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Taniguchi T, Matano K, Maeyama J, et al. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. Vaccine 1999; 18(7-8): 743-51.
21. Kundu J, Mazumder R, Srivastava R, Srivastava BS. Intranasal immunization with recombinant toxin-coregulated pilus and cholera toxin B subunit protects rabbits against Vibrio cholerae O1 challenge. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 56(2): 179-84.
22. Zeighami H, Sattari M, Rezayat M. Purification of the recombinant beta subunit of Vibrio cholera entrotoxin. J Arak Univ Med Sci 2011; 14(3): 27-35. [In Persian].
23. Lebens M, Shahabi V, Backstrom M, Houze T, Lindblad N, Holmgren J. Synthesis of hybrid molecules between heat-labile enterotoxin and cholera toxin B subunits: potential for use in a broad-spectrum vaccine. Infect Immun 1996; 64(6): 2144-50.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 30.01.2014
Vol. 32, No. 279, 4th Week, May 2014
Accepted: 20.04.2014

Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate

Shahram Nazarian PhD[1], Mohhamad Ali Arefpour MSc[1], Mohhamd Javad Bagheripour[2], Golamreza Olad PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Cholera is a lethal diarrheal disease caused by Vibrio cholerae. Cholera toxin is the major virulence factor in pathogenesis of Vibrio cholerae. The B subunit of the enterotoxin, which is responsible for toxin binding to eukaryotic cells, has immunogenic properties. The aim of this study was bioinformatic investigation and production of recombinant cholera toxin subunit B (CtxB).

Methods: CtxB gene was analysed for rare codons and gene optimization was performed using optimization software. Recombinant pET28a/ctxb plasmid was transformed to E. coli BL21 DE3 and expression was induced with Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The protein expression was evaluated using Sodium dodecyl sulphate- Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blotting analysis. The recombinant protein was purified using Nickel-Nitrilotriacetic acid (Ni–NTA) affinity chromatography.

Findings: Codon adaptation index (CAI) on the native gene was 0.61, while the optimized sequence had a CAI of 0.92. Percentage of codon having high-frequency distribution was improved to 67%. Restriction analysis confirmed cloning of the CtxB gene into pET28a vector. Western blotting showed specific reactivity of recombinant protein with anti-CTX antibody. The total yield of purified protein was 9 mg/l.

Conclusion: The results indicated that CtxB gene optimization is a useful approach to high-level expression of recombinant protein. The protein could be produced in capsulated form for oral immunization purpose.

Keywords: Cholera toxin, Cholera enterotoxin subunit B (CtxB), Gene optimization, Recombinant protein

Citation: Nazarian Sh, Arefpour MA, Bagheripour MJ, Olad G. **Bioinformatical Study and Evaluation of Expression of Cholera Toxin Subunit B Optimized Gene as a Vaccine Candidate.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(279): 378-87

1- Biology Research Centre, School of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
2- PhD Student in Nanobiotechnology, Biology Research Centre, School of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3- Applied Biotechnology Research Centre, Baqitatolah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Shahram Nazarian, Email: nazarian56@gmail.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۹/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۰

تأثیر ۸ ماه تمرین مقاومتی بر سطوح GH (Growth hormone)، IGFBP۳ (Insulin-like growth factor binding protein۳) و IGF۱ (Insulin-like growth factor۱) پلاسمای دو بیمار مبتلا به سوختگی شدید

نسیم بهزادنژاد[۱]، سید محمد مرندی[۲]، دکتر فهیمه اسفرجانی[۳]، دکتر احمد عابدی[۴]، فرشته بردیا[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: افراد مبتلا به جراحت‌های حرارتی، افزایش کاتابولیسم پروتئین، تأخیر بهبود زخم، پاسخ ایمنی ضعیف و شیوع عفونت دارند. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر ۸ ماه تمرین مقاومتی بر سطوح GH (Growth hormone)، IGFBP۳ (Insulin-like growth factor binding protein۳) و IGF۱ (Insulin-like growth factor۱) پلاسمای افراد مبتلا به سوختگی شدید بود.

روش‌ها: روش پژوهشی از نوع مورد منفرد با طرح خط پایه‌ی چندگانه‌ی شرکت کنندگان بود. آزمودنی‌های این پژوهش دو زن با سوختگی شدید (درجه‌ی ۳) در دامنه‌ی سنی ۳۰-۲۰ سال در بیمارستان سوانح سوختگی مرکزی شهر بودند، که پس از تعیین موقعیت خط پایه، به صورت پلکانی وارد طرح پژوهشی شدند. بیماران طی ۸ ماه مداخله‌ی انفرادی، تمرین‌های مقاومتی انجام دادند و یک ماه پس از پایان مداخله، به مدت ۲ ماه پی در پی تحت آزمون پیگیری قرار گرفتند. ابزار سنجش پژوهش حاضر نمونه‌گیری خونی، به منظور اندازه‌گیری GH، IGF۱ و IGFBP۳ بود. نمونه‌های خونی به صورت ناشتا و ۲۴ ساعت پس از تمرین‌ها در پایان هر ماه گرفته شد.

یافته‌ها: بر اساس شاخص‌های آمار توصیفی و تحلیل دیداری، تمرین‌های مقاومتی در هر دو آزمودنی موجب تغییر در سطوح IGF۱، GH و IGFBP۳ شد. PND (Percentage of non-overlapping data) در GH ۷۵ درصد برای آزمودنی اول و ۸۷/۵ درصد برای آزمودنی دوم و PND در IGF۱ و IGFBP۳ ۱۰۰ درصد برای هر دو آزمودنی به دست آمد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین مقاومتی طولانی مدت بتواند باعث افزایش عوامل رشدی در افراد مبتلا به سوختگی شدید شود و یک محرک قوی برای سنتز پروتئین در این افراد باشد، یا از اثرات کاتابولیکی به وجود آمده پس از سوختگی و یا روند معکوس و کاهش بیش از حد این عوامل رشدی، پس از سوختگی جلوگیری کند و در نتیجه، باعث تسریع در بهبود جراحت‌ها شود.

واژگان کلیدی: سوختگی، Growth hormone، Insulin-like growth factor۱، Insulin-like growth factor binding protein۳، تمرین مقاومتی، پژوهش مورد منفرد

ارجاع: بهزادنژاد نسیم، مرندی سید محمد، اسفرجانی فهیمه، عابدی احمد، بردیا فرشته. **تأثیر ۸ ماه تمرین مقاومتی بر سطوح GH (Growth hormone)، IGFBP۳ (Insulin-like growth factor binding protein ۳) و IGF۱ (Insulin-like growth factor۱) پلاسمای دو بیمار مبتلا به سوختگی شدید.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۹): ۳۸۸-۴۰۷

۱- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم تربیتی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه روان‌شناسی کودکان با نیازهای خاص، دانشکده‌ی علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: نسیم بهزادنژاد
Email: nasrin_behzadnezhad@yahoo.com

مقدمه

یکی از حوادثی که جامعه ی بشری را تهدید می‌کند و می‌تواند صدمات جبران ناپذیری به زندگی بشر وارد کند، آتش‌سوزی و به دنبال آن سوختگی افراد می‌باشد. حادثه‌های شدید و مهلک مثل سوختگی برقی، شیمیایی، رادیو اکتیو و حرارتی یکی از ویران کننده‌ترین حادثه‌هایی است که خیلی سخت می‌شود از آن‌ها جان سالم به در برد و این به دلیل دردهای غیر قابل تحملی است که در مراحل اولیه بعد از حادثه برای فرد پیش می‌آید (۱).

سوختگی شدید با هایپرمتابولیسم و کاتابولیسم عضلانی (۴-۲)، همچنین از دست رفتن عضلات و کاهش ذخایر پروتئین عضلات همراه است (۵-۴، ۲). پاسخ هایپرمتابولیک ۵ روز پس از سوختگی شروع می‌شود و بیشتر از ۲۴ ماه ادامه می‌یابد (۳) و باعث از دست رفتن بافت بدون چربی و تراکم استخوانی و تأخیر در بهبود زخم می‌شود (۶).

کاهش شدید وزن بدن اغلب پس از سوختگی شدید اتفاق می‌افتد که ناشی از افزایش سوخت و ساز بدن و ناکافی بودن جذب کالری برای افراد حادثه دیده است. مصرف انرژی در سه هفته ی اول بعد از سوختگی شدید نسبت به مواقع معمولی دو برابر است و در ۵ تا ۶ هفته ی اول توازن نیتروژن، منفی خواهد شد (۷). کاتابولیسم توده‌ی بدون چربی بدن برای ۹ ماه بعد از سوختگی شدید مشاهده شده است و این کاهش توده‌ی بدون چربی با افزایش مصرف غذا هم ادامه می‌یابد (۸). این حالت به وسیله‌ی یک دوره ی بی‌فعالیتی که به دنبال سوختگی به وجود می‌آید، شدیدتر می‌شود (۹). همچنین آسیب سوختگی بیشتر با متابولیسم غیر طبیعی چربی‌ها همراه است و شامل کاهش حساسیت گیرنده های لیپولیتیک به کاتکولامین‌ها و کاهش در اندازه‌ی بافت چربی می‌باشد (۱۰).

بسیاری از تحقیقات اخیر که روزانه هورمون رشد را اندازه‌گیری کردند، کاهش معنی‌داری در GH (Growth hormone) یک ماه پس از سوختگی نشان داده‌اند و در طول ۴ هفته پس از سوختگی، بیماران سطح بالایی از استرس را نشان می‌دهند که ممکن است با کاهش مشاهده شده در سطوح GH مرتبط باشد (۱۱). اگر چه این کاهش بلافاصله پس از سوختگی مشاهده شد، اما ۱۰-۸ روز پس از سوختگی، شروع به کاهش کرده و کاهش یکنواختی را نشان داده است (۳). اختلال در رشد بدن نیز به ویژه در کودکان با سوختگی بیشتر از ۴۰ درصد نشان داده شده است (۱۲-۱۱، ۵، ۲) که حداقل ۹ ماه با کاتابولیسم عضلانی و حداقل ۲ سال تأخیر در رشد پس از سوختگی همراه است (۷).

بعضی از مطالعات تأخیر بیشتر از ۳ سال در رشد کودکان را پس از سوختگی گزارش داده‌اند (۱۲). دلایل تأخیر در رشد به طور کامل مشخص نیست؛ اما گزارش شده است که سطوح GH پلاسما در بزرگسالان پس از سوختگی کاهش می‌یابد (۱۳). همچنین کاهش غلظت IGF۱ (Insulin like growth factor۱) و IGFBP۳ (Insulin like growth factor binding protein۳) پلاسما نیز بلافاصله پس از سوختگی شروع می‌شود و به طور معنی‌داری به کاهش خود ادامه می‌دهد (۱۴، ۳).

هورمون‌ها یک نقش مرکزی در کنترل بازگشت پروتئین ایفا می‌کنند. سنتز پروتئین به وسیله‌ی

هورمون‌های آنابولیک مانند تستوسترون، GH، انسولین و IGF۱ تنظیم می‌شود؛ در حالی که تجزیه ی پروتئین به وسیله‌ی هورمون‌های کاتابولیک به ویژه کورتیزول انجام می‌شود (۱۵). GH یک هورمون پپتیدی است که به وسیله‌ی سلول‌های سوماتوتروف هیپوفیز قدامی تولید و توسط هورمون‌های هیپوتالاموسی تنظیم می‌شود. ترشح GH یک الگوی متناوب دارد و محرک های گوناگون بر مقدار و تکرار ترشح آن مؤثر است، GH بر متابولیسم پروتئین، کربوهیدرات و چربی اثر می‌گذارد، همچنین گیرنده‌های این هورمون در همه‌ی سلول‌ها وجود دارد و اثر مستقیم بر بسیاری از بافت ها مانند عضلات اسکلتی دارد. ترشح GH به وسیله ی یک سیستم بازخورد منفی تنظیم می شود؛ به طوری که افزایش IGF۱ سرم موجب توقف ترشح GH می‌شود (۱۶). هورمون رشد تنظیم کننده‌ی اصلی سنتز IGF۱ کبدی و IGFBP۳ است و کبد اندام اصلی مسؤول در تولید IGF۱ سرم می‌باشد (۱۶).

بسیاری از اثرات متابولیکی GH به وسیله‌ی هورمون پپتیدی IGF۱ واسطه‌گری می شود (۱۷). IGF۱ هورمون پلی پپتیدی کوچک با ساختاری شبیه انسولین است و سطوح آن با عوامل فیزیولوژیک مانند خواب، هورمون‌ها، ورزش و عوامل پاتولوژیک مانند بیماری، استرس و غیره تعدیل می شود (۱۸). دو ایزوفرم از IGF وجود دارد که یکی به وسیله ی کبد تولید می شود و عملکرد اندوکرین دارد و در هر دو حالت استراحت و کار عضلانی بیان می شود. نوع دیگر، MGF (Mechano growth factor) است که نیمه ی عمر کوتاه‌تری دارد و بیشتر در عضلات و در زمان کار عضلانی بیان می شود. احتمال می رود که MGF عملکرد اتوکرین/پاراکرین داشته باشد (۱۹). IGF۱ نقش مستقیمی در هموستاز گلوکز بدن به وسیله ی تحریک برداشت گلوکز توسط عضله ی اسکلتی بازی می‌کند (۲۰). بر خلاف GH، سطوح IGF۱ سرم در انسان های سالم، ثابت است و تغییرات فردی کمی را نشان می دهد. اگر چه سطوح بالاتر یا پایین‌تر از حد طبیعی IGF۱ سرم، مطابق با سن نشانه‌ی خوبی برای عدم عملکرد GH است؛ اما با توجه به این که عوامل دیگری مانند وعده ی غذایی و مشکلات کبدی بر سطوح IGF۱ سرم مؤثر است، باید با دقت بیشتری بررسی گردد (۱۶).

۶ نوع IGF متصل به پروتئین وجود دارد. IGFBPs ابتدا از سرم جدا می شوند و پروتیئن‌هایی حدود ۳۰ KDa هستند که می‌توانند به IGF۱ و IGF۲ متصل شوند. بیشتر IGF۱ سرم به صورت کمپلکس ۳ قسمتی IGFBP۳ یا زیر واحد اسید لابیل یافت می‌شود، که در سرم نیمه‌ی عمر و رهایی IGF۱ را به بافت افزایش می‌دهد و در بافت‌ها نیز، فعالیت IGF۱ را تعدیل می کند، چون IGFBP۳ میل بیشتری به IGFs در مقایسه با گیرنده‌ها دارد (۱۶).

از آن جایی که GH به عنوان یک عامل آنابولیکی قوی و تعدیل کننده‌ی سلامت، از پاسخ‌های متابولیکی پس از آسیب جلوگیری می کند (۱۷)، تجویز دوزی از GH در فاز حاد پس از سوختگی (۲) می‌تواند منجر به کاهش کاتابولیسم، حفظ تراکم سلولی بدن، بهبود سنتز پروتئین، افزایش سرعت بهبود زخم و کاهش تأخیر در رشد شود (۱۲، ۵-۴). کاهش معنی‌داری در زمان بهبود زخم در بیماران سوخته با استفاده از ۰/۲ mg/kg/day هورمون رشد در روز مشاهده شده است (۲۱).

IGF۱ باعث افزایش رشد بافتی و تداوم اثرات آنابولیک در بزرگسالان می شود (۱۸) و به عنوان محرک سنتز پروتئین و مانع تجزیه‌ی آن در عضله‌ی اسکلتی پس از سوختگی شناخته شده است. همچنین تزریق IGF۱ همراه با GH یا IGFBP۳ برای کاهش کاتابولیسم عضلانی بدون هیچ اثر جانبی مناسب بوده است. مطالعات متعددی نقش IGF۱ را در محدود کردن متابولیسم تأیید کرده است. همچنین با تزریق IGF۱ از واکنش‌های کاتابولیک در موش‌های سوخته جلوگیری شده است (۲۳-۲۲).

شواهد متعددی در مورد اثر IGF۱ در سازگاری‌های هایپرتروفی عضلانی در تمرین‌های مقاومتی به ویژه در بهبود عضلات حیوانات وجود دارد (۲).

ورزش یک عامل مهم و مؤثر بر کاهش کاتابولیسم عضله پس از سوختگی شدید می باشد (۱۱) و به عنوان یک محرک قوی برای آزادسازی هورمون رشد، پرولاکتین و کورتیزول شناخته شده است (۱۳). به ویژه تمرین مقاومتی، که مقادیرGH را افزایش می‌دهد (۲۴). مقدار پاسخ به ورزش بسته به نوع، شدت، مدت، فراخوانی عضله، زمان استراحت، جنس، سن، ترکیب بدن و وضعیت سلامتی و تمرینی افراد متفاوت است (۲۵-۲۴). غلظت GH، ۳۰ دقیقه پس از تمرین مقاومتی در مردان و زنان افزایش مشابهی را نشان می دهد. اگر چه سطوح استراحتی GH در زنان به طور معنی‌داری بالاتر از مردان است (۲۴)، با این حال مکانیزم تنظیم GH در پاسخ به تمرین به طور کامل مشخص نشده است (۲۵). بعد از یک دوره‌ی طولانی تمرین مقاومتی، افزایش در سطوح هر دو نوع ایزوفرم IGF۱ و سطوح پروتئین وجود دارد. تمرین مقاومتی نسبت به تحریک الکتریکی عضله در بازگشت ذخایر عضلانی و تراکم آن مؤثرتر است. انواع تمرین مقاومتی به عنوان یک روش مؤثر منجر به هایپرتروفی عضلانی می‌شود و قدرت عضلانی و عملکرد اجرایی در افراد بزرگسال را افزایش می‌دهد (۱۹).

IGFs سنتز پروتئین طی تمرین مقاومتی را افزایش می‌دهد و باعث افزایش هایپرتروفی می‌شود (۲۴). در سطوح استراحتی IGF۱ مردانی که تمرین مقاومتی انجام دادند نسبت به گروه فاقد تمرین، افزایش مشاهده شد. همچنین افزایش در سطوح استراحتی IGF۱ به خصوص در تمرین های دارای حجم بالا در زنان مشاهده شده است (۲۴). اگر چه افزایش IGFBP۳ یک ساعت پس از تمرین مقاومتی گزارش شده است، با این حال در مطالعه ی دیگر کاهش معنی‌داری در IGFBP۳ در هفته‌های ۲۵-۱۳ در برنامه‌ی تمرین مقاومتی دیده شده است (۲۴).

در مطالعه‌ای پس از ۸ هفته تمرین در مردان جوان غیر ورزشکار، تغییر معنی داری در سطوح IGF۱ و IGFBP۳ مشاهده نشد (۲۶)، در حالی که در پژوهش دیگر کاهش معنی داری در سطوح IGF۱ و IGFBP۳ در برنامه ی ۲ ماهه در کودکان چاق مشاهده شد (۲۷). همچنین افزایش معنی‌داری در GH پس از تمرین مقاومتی مشاهده شد، اما در سطوح IGF۱ پس از تمرین این گونه نبود. هر چند ۱ ساعت پس از تمرین افزایش یافت که متأثر از استراحت بین ست‌ها بوده است (۲۸). کاهش غیر معنی داری نیز با یک جلسه تمرین در سطوح IGF۱ مشاهده شد که این پاسخ پس از ۶ هفته بدون تغییر بود (۲۹). سطوح GH و IGF۱ در دانشجویان غیر ورزشکار پس از

یک جلسه تمرین افزایش یافت (۳۰).

راه‌ها و تدبیرهایی برای درمان سوختگی و برگرداندن افراد سانحه دیده به زندگی عادی وجود دارد که در طی دو دهه‌ی گذشته رایج‌ترین روش درمان بیماران با سوختگی شدید، برداشتن قسمت‌های سوخته شده و باندپیچی آن‌ها می‌باشد. این روش‌های جراحی در بعضی مواقع می‌تواند موجب مرگ فرد شود یا او را نجات بخشد (۳۱).

همان‌طور که در تحقیقات نشان داده شده است، افراد مبتلا به سوختگی شدید حتی تا ۲۴ ماه آثار مضر کاتابولیکی و التهابی را در بدن خود دارند. از طرفی، تحقیقات نشان می‌دهد ورزش و فعالیت بدنی منظم سبب افزایش هورمون‌ها و عواملی رشدی آنابولیک می‌شود و از آن جایی که شرکت بزرگسالان در ورزش‌های مقاومتی باعث افزایش نیروی عضله و هیپرتروفی می‌شود و با توجه به این که فعالیت‌های روزمره، وظایفی جامع هستند که مستلزم نیروی عضله و تحملند، یک برنامه‌ی مقاومتی مؤثر ممکن است در توان‌بخشی افراد با سوختگی شدید، با افزایش نیروی عضلانی و ظرفیت انجام کار و کاهش کاتابولیک عضله و التهاب درونی آن‌ها اثرگذار باشد (۳۲).

طراحی تمرین‌های مقاومتی با استفاده از انقباض‌های درون‌گرا، با تکرار زیاد و با مقاومت و بار کم، قدرت عضلانی افراد را بدون عوارض جانبی بر استخوان، عضله یا بافت پیوندی افزایش می‌دهد (۶)؛ به طوری که تمرین‌های مقاومتی باعث افزایش ۵۰-۳۰ درصد در قدرت عضله‌ی کودکان پس از ۱۲-۸ هفته می‌شود (۲۳). با استناد به تحقیقات و نظریه‌های موجود محقق قصد دارد، بررسی کند که «آیا انجام ورزش‌های مقاومتی، می تواند هورمون‌های آنابولیک و عوامل شبه رشدی را افزایش دهد، بعضی هورمون‌های استرس پس از سوختگی را کاهش دهد و بیمار را از انجام عمل‌های جراحی متناوب به منظور جلوگیری از تغییر شکل مفاصل، بازگرداندن عضلات از دست رفته و کاهش سریع دردهای ناشی از زخم بی‌نیاز سازد؟».

روش‌ها

الف) طرح پژوهشی

این پژوهش از نوع پژوهش‌های مورد منفرد (Single subject research) است و در آن از طرح خط پایه‌ی چندگانه در میان آزمودنی‌ها (Multiple baseline across participants) استفاده شده است. طرح خط پایه‌ی چندگانه، شامل کاربرد یک موقعیت مداخله در دو یا چند خط پایه‌ی مختلف در یک مدل زمانی پلکانی (Time-staggered fashion) است. در واقع، در این طرح ابتدا داده‌های خط پایه برای هر تعداد آزمودنی پژوهش گردآوری می‌شود و سپس مداخله برای آزمودنی اول آغاز می‌شود؛ در صورتی که آزمودنی‌های دیگر همچنان در موقعیت خط پایه قرار دارند. سپس در مرحله‌ی بعد، آزمودنی دوم نیز علاوه بر آزمودنی اول مداخله دریافت می‌کند (مدل زمانی پلکانی برای ارایه‌ی مداخله) (۳۳).

منطق زیربنایی طرح‌های آزمایشی مورد منفرد همانند طرح‌های گروهی است و تأثیر مداخله با مقایسه‌ی شرایط متفاوتی که به آزمودنی ارایه می‌گردد، بررسی می‌شود. عملکرد آزمودنی در مرحله ی پیش از مداخله یعنی مرحله‌ی خط پایه، برای پیش‌بینی رفتار آزمودنی در آینده به کار برده

می‌شود. طرح‌های خط پایه‌ی چندگانه، قابلیت اثبات روابط علت و معلولی را در شرایط آزمایشی دارند. این طرح‌ها با ورود پلکانی آزمودنی‌ها، پژوهشگر را قادر می‌سازد که اثر متغیرهای مزاحم را حذف کند و تغییر متغیر وابسته را فقط بر اساس متغیر مستقل تبیین نماید (۳۳).

در پژوهش حاضر، پس از ۳ جلسه اندازه‌گیری در خط پایه برای آزمودنی اول، تمرین مقاومتی برای او به صورت انفرادی آغاز گردید و آزمودنی دیگر در موقعیت خط پایه باقی ماند. همزمان با جلسه‌ی سوم مداخله‌ی آزمودنی اول، مداخله‌ی آزمودنی دوم که ۵ نقطه‌ی خط پایه داشت، آغاز گردید.

ب) آزمودنی‌ها

دو زن مبتلا به سوختگی شدید در بیمارستان سوانح و سوختگی مرکزی در این تحقیق شرکت کردند. معیار ورود به تحقیق سوختگی درجه‌ی ۳ و دامنه‌ی سنی ۳۰-۲۰ سال و جنسیت زن بود.

ویژگی‌های آزمودنی‌ها به شرح زیر بود:

ش- ص ۲۵ ساله که در مغازه‌ی مواد پزشکی همسرش بر اثر تماس استون صنعتی با هیتر برقی مبتلا به سوختگی شدید در ناحیه ی ران و ساق پای چپ و ران پای راست، ناحیه ی شکمی و باسن و اندکی در دست ها شده بود. پس از بستری در بیمارستان، ۲ ماه در ICU (Intensive care unit) به سر برده و امیدی به ادامه ی زندگیش نبوده است، اما پس از آن کمی بهبود یافت و در بخش عادی بستری شد.

ف- ت ۲۷ ساله که در راه مسافرت با ماشین شخصی و همراه خانواده در اثر سانحه‌ی تصادف دچار آتش‌سوزی شده بود. سوختگی در تمام ناحیه‌ی صورت، دست‌ها و پاها بود.

ج) ابزار اندازه‌گیری

از نمونه گیری خونی برای اندازه گیری GH، IGF۱ و IGFBP۳ پلاسما استفاده شد. همه‌ی نمونه‌ها در ساعت ۸:۳۰ صبح در پایان هر ماه ۲۴ ساعت پس از آخرین وهله ی تمرینی گرفته شد. در موقعیت مداخله و پیگیری بدون انجام تمرینات پس از پایان هر ماه، نمونه‌ها جمع‌آوری می‌شد.

د) جلسات تمرین

تمرین مقاومتی برای دو آزمودنی، ۴ ماه پس از سوختگی آغاز شد و برای ۸ ماه سه روز در هفته ادامه یافت. در ابتدای همه ی جلسات به مدت ۱۰ دقیقه گرم کردن با دوچرخه‌ی ثابت و بعد از آن تمرین‌های مربوط به هر جلسه انجام می‌شد. تمرین‌های اندام فوقانی شامل فلکشن آرنج برای تقویت عضله ی دو سر بازو، فلکشن- اکستنشن آرنج در بالای سر برای تقویت عضله ی سه سر بازو، ابداکشن بازو برای دو دست به طور همزمان، فلکشن بازو و حرکت پروانه بود و برای اندام تحتانی از فنرهای آویزان که به وسیله‌ی قلاب به پا متصل می‌شد، استفاده گردید و تمرین‌ها شامل فلکشن- اکستنشن مفصل ران در حالت خوابیده به طوری که فنر به عنوان مقاومت به پا وصل شده و پا را بالا و پایین می آورد، اجرا شد. سپس فرد به سمت راست می چرخید و با پای چپ ابداکشن- اداکشن را انجام می داد و بعد همین حرکت روی سمت مخالف انجام می شد. همچنین فرد به شکم خوابیده و فنر را با فلکشن- اکستنشن زانو برای تقویت عضلات همسترینگ حرکت می‌داد. در حالت نشسته فنر موازی با زمین به میله ها وصل و حرکت جلوی ران با فلکشن- اکستنشن مفصل زانو انجام می شد و در آخر، با سرد کردن عضلات، جلسه ی

تمرین به پایان می‌رسید.

به دلیل محدودیت های حرکتی آزمودنی ها از کمترین وزنه‌ای که فرد می‌توانست به اندازه‌ی ۵ تکرار در سه وهله اجرا کند، استفاده شد. پس از سازگاری عضلات با برنامه، تعداد تکرار به ۸ و در ادامه‌ی تمرین‌ها به ۱۲ تکرار رسید. پس از این مرحله، وزنه‌ی مورد استفاده کمی سنگین‌تر می‌شد. در استفاده از فنر نیز بعد از رسیدن به ۱۲ تکرار، فرد با ۲ فنر و در ادامه، اضافه بار تمرین با افزایش فنرها انجام می‌گرفت.

آزمودنی ها قبل از انجام طرح و در طول درمان در هیچ گونه فعالیت بدنی یا فیزیوتراپی شرکت نداشتند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوهش، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از تحلیل دیداری (Visual analysis) نمودارها و شاخص روند (Trending)، ثبات (Stability)، درصد داده‌های غیر همپوش PND (Percentage of non-overlapping data) و درصد داده‌های همپوش POD (Percentage of overlapping data) استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نمونه گیری در سطوح IGF۱، GH و IGFBP۳ در دو آزمودنی در مراحل خط پایه، مداخله و پیگیری در جداول ۱ و ۲ آمده است.

یافته های جداول ۱ و ۲ به صورت نمودار داده ها در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۱. داده‌های GH، IGF۱ و IGFBP۳ در موقعیت خط پایه برای دو آزمودنی

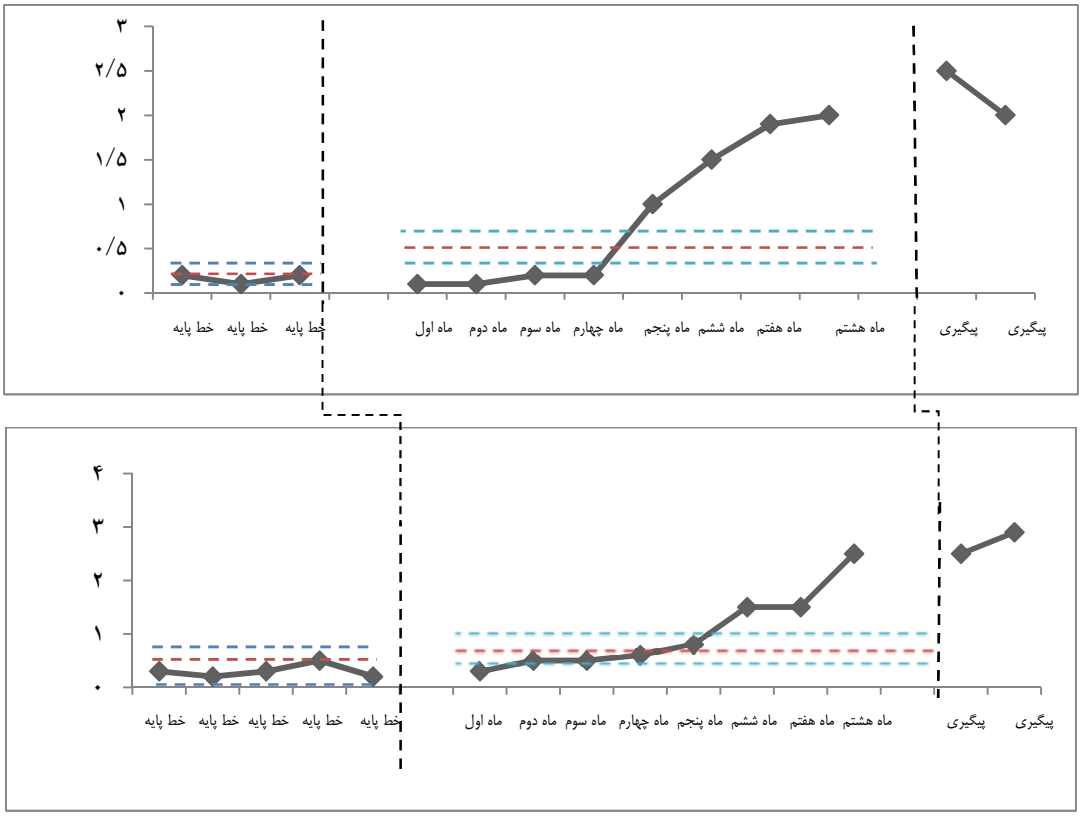
	آزمودنی	جلسات						
		جلسه‌ی اول	جلسه‌ی دوم	جلسه‌ی سوم	جلسه‌ی چهارم	جلسه‌ی پنجم	جلسه‌ی ششم	جلسه‌ی هفتم
GH	Sh	۰/۲	۰/۱	۰/۲				
	F	۰/۳	۰/۲	۰/۳	۰/۵	۰/۲		
IGF۱	Sh	۳۸۲/۲	۳۷۰	۳۵۰				
	F	۳۷۰	۳۶۹	۳۶۵	۳۶۳	۳۶۰		
IGFBP۳	Sh	۳۷۶۰	۳۵۹۹	۳۵۴۶				
	F	۳۶۵۰	۳۴۰۵	۳۳۲۵	۳۱۴۵	۳۰۲۳		

GH: Growth hormone; IGF۱: Insulin-like growth factor۱; IGFBP۳: Insulin-like growth factor binding protein۳

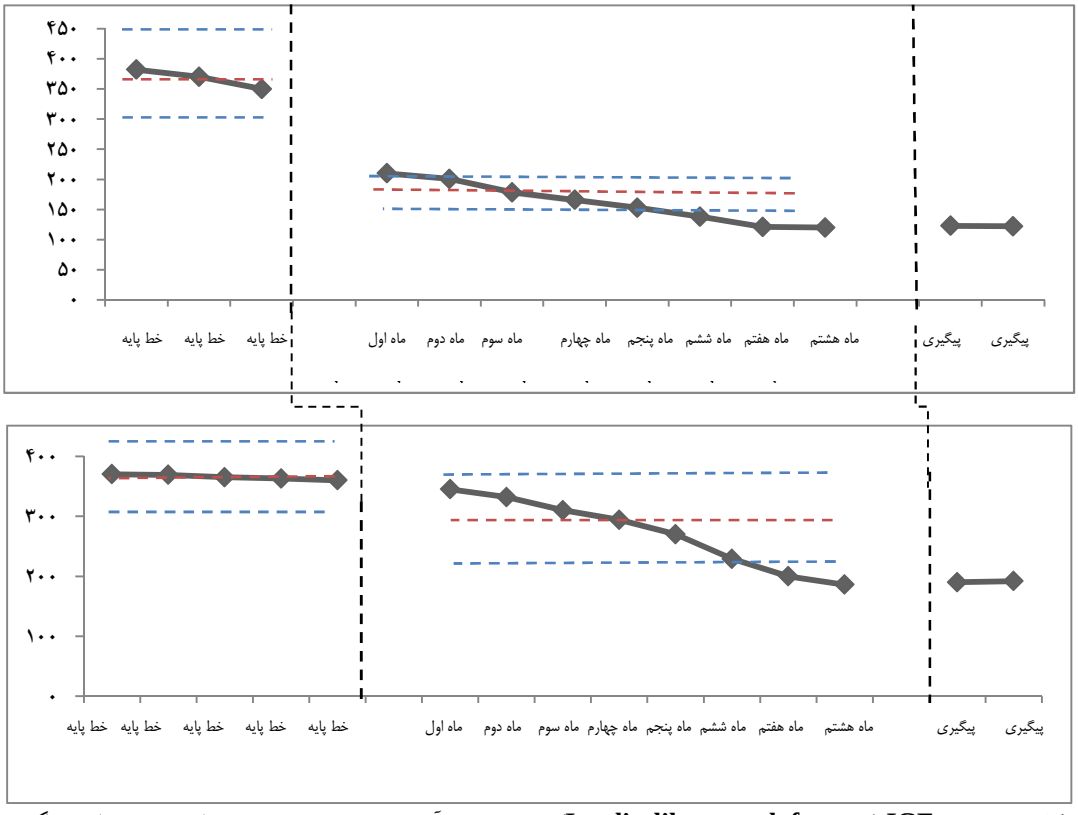
جدول ۲. داده‌های GH، IGF۱ و IGFBP۳ در موقعیت مداخله و پیگیری برای دو آزمودنی

	آزمودنی	جلسات								
		ماه اول	ماه دوم	ماه سوم	ماه چهارم	ماه پنجم	ماه ششم	ماه هفتم	ماه هشتم	پیگیری	پیگیری
GH	Sh	۰/۱	۰/۱	۰/۲	۰/۲	۱/۰	۱/۵	۱/۹	۲۲/۰	۲/۵	۲/۰
	F	۰/۳	۰/۵	۰/۵	۰/۶	۰/۸	۱/۵	۱/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۹
IGF1	Sh	۲۱۰	۲۰۰	۱۷۸	۱۶۶	۱۵۳	۱۳۸	۱۲۱	۱۲۰	۱۲۳	۱۲۲
	F	۳۴۵	۳۳۲	۳۱۰	۲۹۴	۲۷۰	۲۲۹	۲۰۰	۱۸۶	۱۹۰	۱۹۲
IGFBP۳	Sh	۳۰۳۵	۲۹۶۰	۲۸۸۹	۲۷۹۷	۲۷۶۴	۲۷۶۰	۲۷۶۵	۲۷۴۰	۲۷۳۲	۲۷۲۲
	F	۲۷۵۶	۲۶۳۹	۲۶۰۳	۲۵۹۰	۲۵۹۳	۲۵۷۴	۲۵۶۷	۲۵۵۸	۲۶۳۹	۲۶۵۱

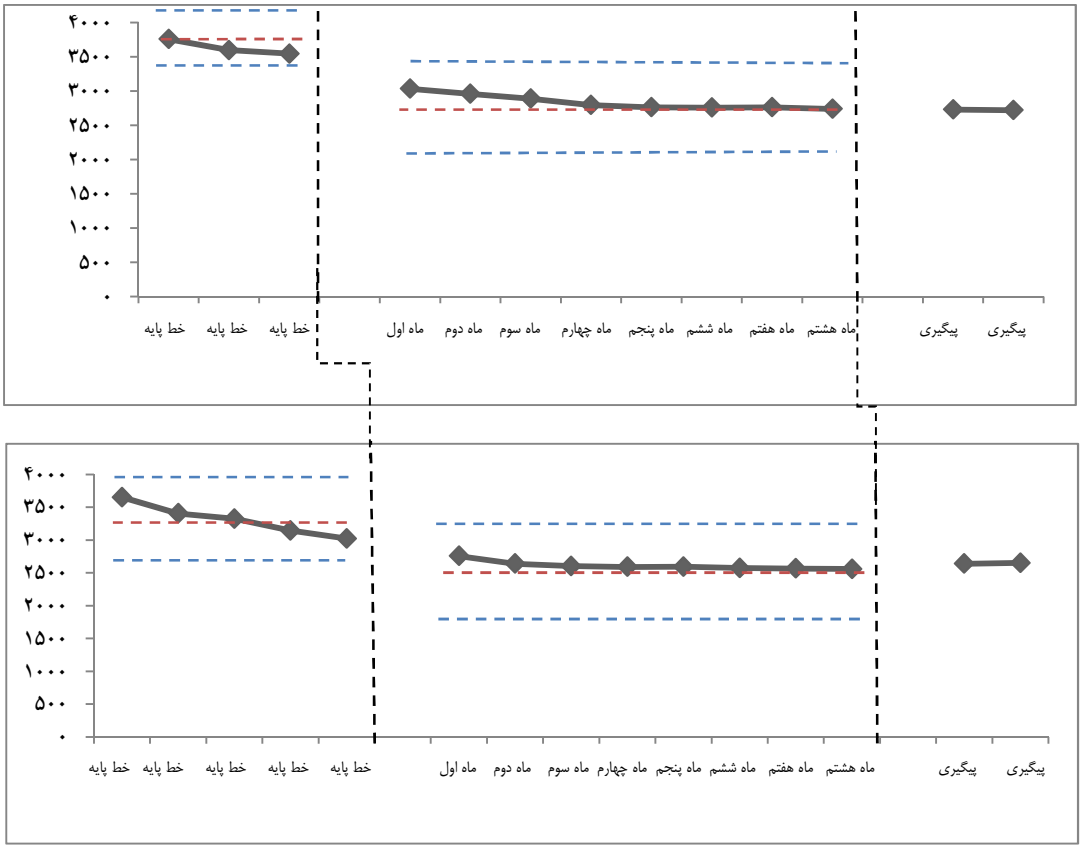
GH: Growth hormone; IGF۱: Insulin-like growth factor۱; IGFBP۳: Insulin-like growth factor binding protein۳



شکل ۱. مقادیر GH (Growth hormone) پلاسمای دو آزمودنی در موقعیت‌های خط پایه، مداخله و پیگیری



شکل ۲. مقادیر IGF۱ (Insulin-like growth factor۱) پلاسمای دو آزمودنی در موقعیت‌های خط پایه، مداخله و پیگیری



شکل ۳. مقادیر IGFBP۳ (Insulin-like growth factor binding protein۳) پلاسمای دو آزمودنی در موقعیت‌های خط پایه، مداخله و پیگیری

برای تحلیل دیداری نمودار داده ها، پس از رسم نمودار برای هر آزمودنی، در مرحله ی اول با استفاده از میانه‌ی داده‌های موقعیت خط پایه و مداخله، خط میانه ی داده ها موازی با محور X کشیده شد و یک محفظه‌ی ثبات (Stability envelope) روی خط میانه قرار گرفت. محفظه ی ثبات یعنی دو خط موازی که یکی پایین و دیگری بالای خط میانه رسم شود. فاصله و دامنه ی بین دو خط، میزان بیرون افتادگی یا تغییر پذیری سری داده‌ها را نشان می‌دهد. با استفاده از معیار ۸۰-۲۰ درصدی، اگر ۸۰ درصد نقاط داده ها زیر یا درون ۲۰ درصد مقدار میانه (محفظه ی ثبات) قرار گیرند، گفته می‌شود داده‌ها ثبات دارد (۱). پس از آن، برای بررسی روند داده‌ها، از روش دو نیم کردن (Split-midd) استفاده شد و محفظه‌ی ثبات خط روند بر اساس معیار ۸۰-۲۰ درصدی رسم شد.

پس از رسم خط میانه و خط روند و محفظه ی ثبات آن‌ها، شاخص‌های آمار توصیفی مانند میانه و میانگین و شاخص های تحلیل دیداری درون موقعیتی و بین موقعیتی مانند تغییر سطح و روند و PND محاسبه شد. PND نشان دهنده‌ی درصد غیر همپوشی نقاط دو موقعیت آزمایشی (خط پایه و مداخله) است. میزان کنترل آزمایشی در پژوهش مورد منفرد، به تغییر سطح از یک موقعیت به موقعیت دیگر و درصد داده های غیر همپوش (PND) بستگی دارد؛ به این معنی که تغییرات اندک در مقادیر متغیر وابسته در طی مداخله‌ای که بعد از یک مسیر داده‌ی

متغیر در موقعیت خط پایه قرار دارد، نسبت به تغییرات اندک در مداخله‌ای که ثبات در مسیر داده‌های خط پایه‌ی وجود داشته است، کنترل آزمایشی کمتری دارد. همچنین، هر چه PND بین دو موقعیت مجاور بالاتر (یا POD پایین تر) باشد، با اطمینان بیشتری می‌توان مداخله را اثربخش دانست.

بر اساس تحلیل دیداری نمودار داده‌های دو آزمودنی در خط میانه، خط روند و محفظه ی ثبات آن‌ها در GH پلاسما به قرار زیر به دست آمد (شکل‌های ۴ و ۵).

خلاصه ی نتایج تحلیل دیداری در دو آزمودنی در سطوح GH در جدول ۳ ذکر شده است.

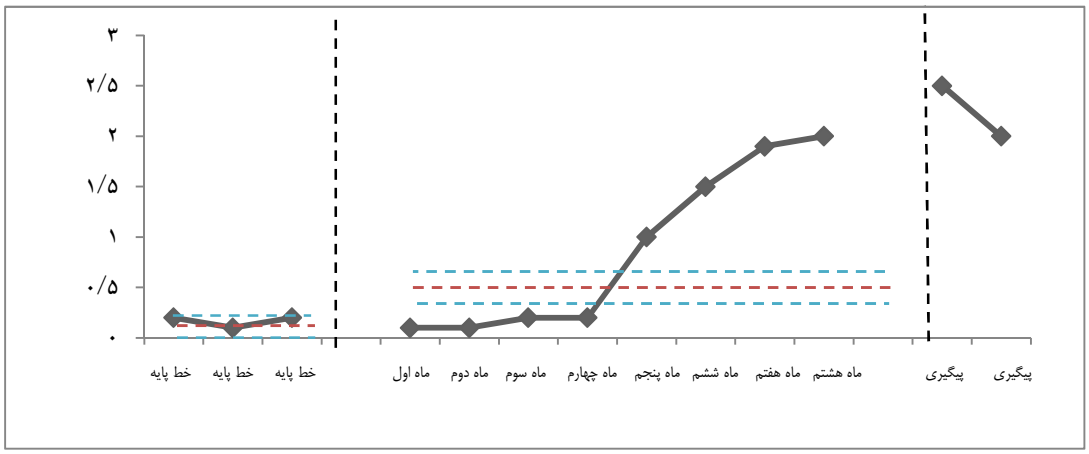
خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آن‌ها برای دو آزمودنی در IGF۱ پلاسما طبق شکل های ۶ و ۷ می‌باشد.

خلاصه ی نتایج تحلیل دیداری در دو آزمودنی در سطوح IGF۱ در جدول ۴ ذکر شده است.

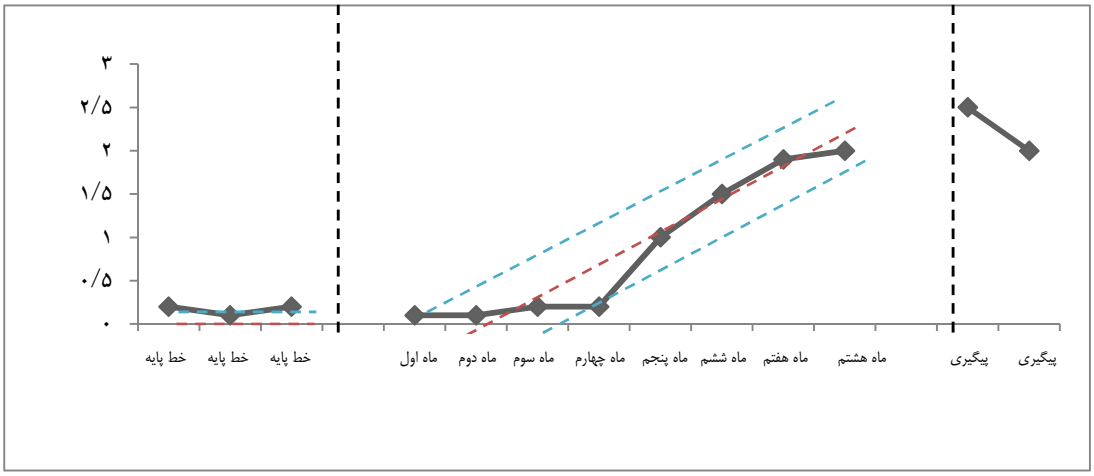
خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آن‌ها برای دو آزمودنی در IGFBP۳ پلاسما طبق شکل‌های ۸ و ۹ می‌باشد.

خلاصه ی نتایج تحلیل دیداری در دو آزمودنی در سطوح IGFBP۳ در جدول ۵ آمده است.

ترسیم خط میانه و محفظه‌ی ثبات برای نمودار داده‌های GH/SH (Growth hormone)

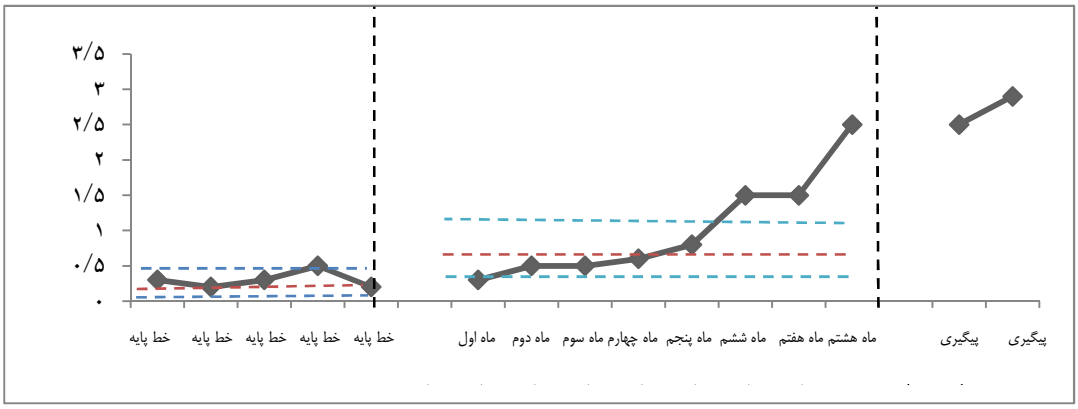


ترسیم خط روند و محفظه‌ی ثبات برای نمودار داده‌های GH/SH

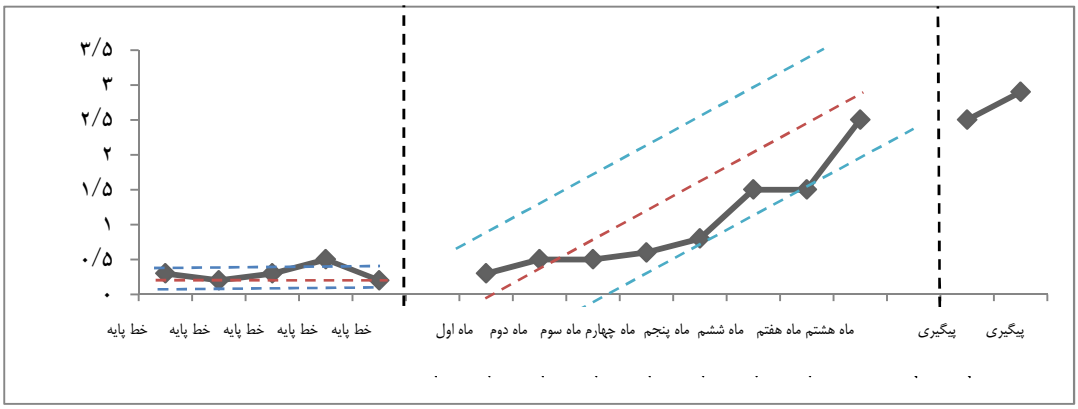


شکل ۴. خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آزمودنی اول (ش- ص)

ترسیم خط میانه و محفظه‌ی ثبات برای داده‌های GH/F (Growth hormone)



ترسیم خط روند و محفظه‌ی ثبات برای داده‌های GH/F



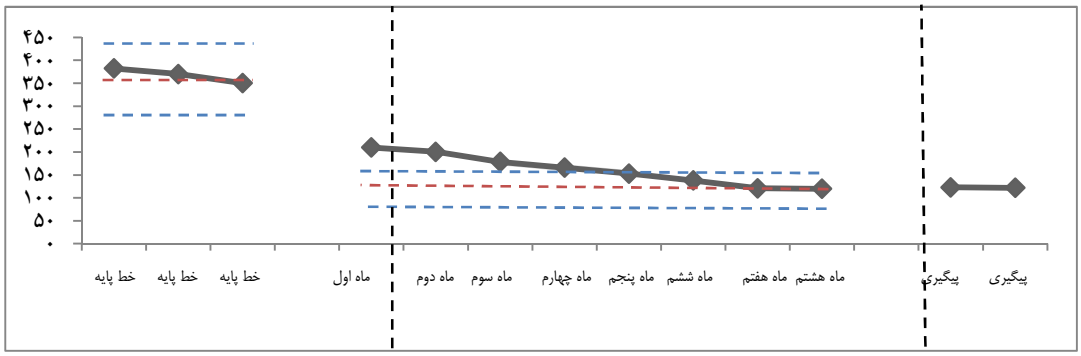
شکل ۵. خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آزمودنی دوم (ف- ط)

جدول ۳. متغیرهای تحلیل دیداری درون موقعیتی و بین موقعیتی برای دو آزمودنی در GH (Growth hormone) پلاسما

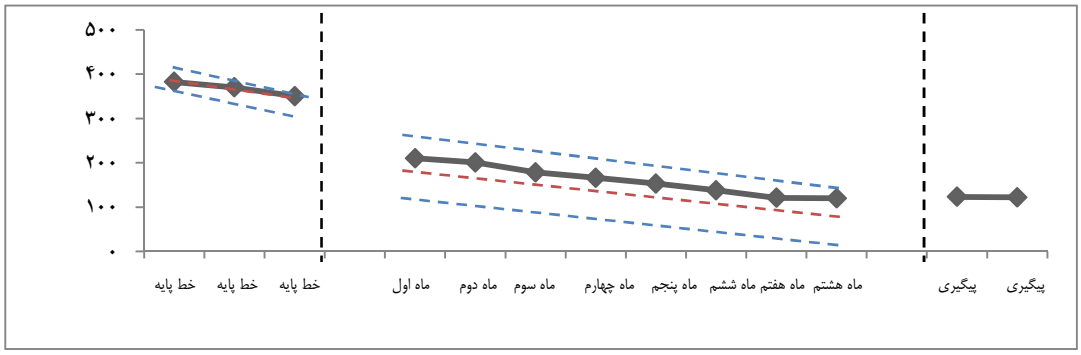
درون موقعیتی					بین موقعیت‌ها			
توالی موقعیت	A		B		مقایسه‌ی موقعیت	B A		
آزمودنی‌ها	اول	دوم	اول	دوم	آزمودنی	اول		دوم
طول موقعیت‌ها	۳	۵	۸	۸		تغییرات روند		
سطح					تغییر جهت			
میانه	۰/۲	۰/۳	۰/۶	۰/۷	اثر وابسته به هدف	مثبت		مثبت
میانگین	۰/۱۶	۰/۳	۰/۸۷	۱/۰۲	تغییر ثبات	باثبات به باثبات		باثبات به باثبات
دامنه‌ی تغییرات	۰/۱-۰/۲	۰/۲-۰/۵	۰/۱-۲/۰	۰/۳-۲/۵		تغییر در سطح		
دامنه‌ی تغییرات محفظه‌ی ثبات	باثبات	باثبات	بی‌ثبات	بی‌ثبات	تغییر نسبی	۰/۱۵ به ۰/۲		۰/۵ به ۰/۴
	تغییر سطح				تغییر مطلق	۲/۰ به ۰/۲		۰/۵ به ۰/۳
تغییر نسبی	۰/۱-۰/۲	۰/۲-۰/۴	۰/۱-۱/۷	۰/۵-۱/۵	تغییر میانه	۰/۶ به ۰/۲		۰/۷ به ۰/۳
تغییر مطلق	۰/۲-۰/۲	۰/۲-۰/۳	۰/۱-۲/۰	۰/۳-۲/۵	تغییر میانگین	۰/۸۷ به ۰/۱۶		۱/۰۲ به ۰/۳۰
روند						همپوشی‌ها		
جهت	هم‌سطح	هم‌سطح	صعودی	صعودی	PND	٪۷۵		٪۸۷
ثبات	باثبات	باثبات	باثبات	باثبات	POD	٪۲۵		٪۱۳
مسیرهای چندگانه	خیر	خیر	خیر	خیر				

POD: Percentage of overlapping data; PND: Percentage of non-overlapping data

ترسیم خط میانه و محفظه ی ثبات برای نمودار داده های IGF1/SH (Insulin-like growth factor۱)

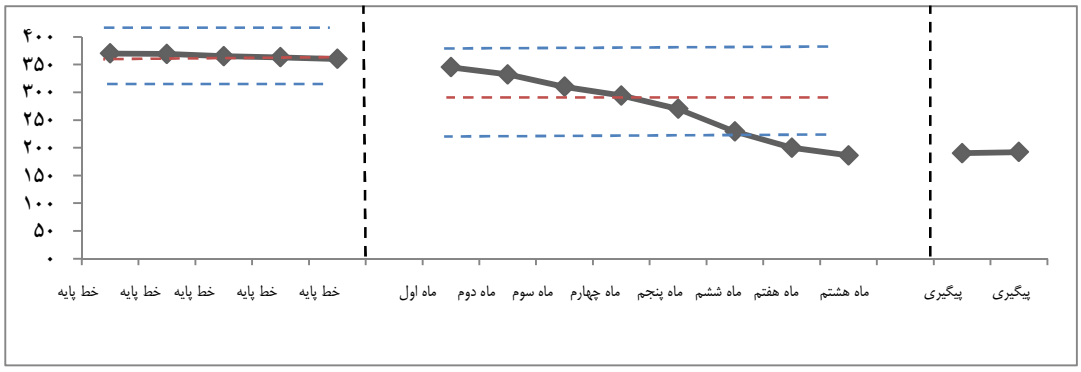


ترسیم خط روند و محفظه ی ثبات برای نمودار داده های IGF1/SH

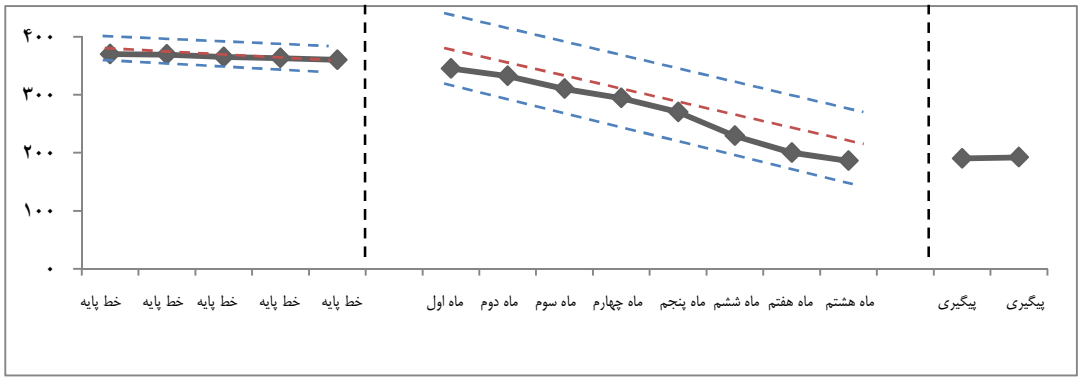


شکل ۶. خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آزمودنی اول (ش- ص)

ترسیم خط میانه و محفظه ی ثبات برای نمودار داده های IGF1/F



ترسیم خط روند ومحفظه ی ثبات برای نمودار داده های IGF1/F



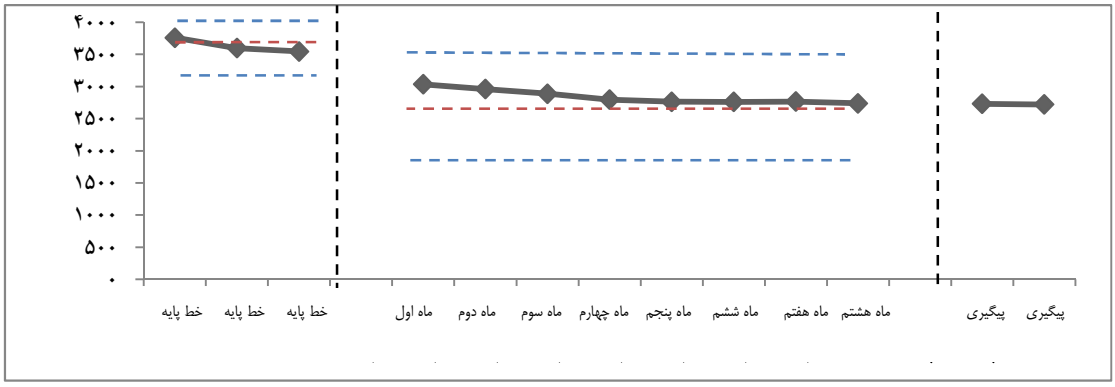
شکل ۷. خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آزمودنی دوم (ف- ط)

جدول ۴. متغیرهای تحلیل دیداری درون موقعیتی و بین موقعیتی برای دو آزمودنی در IGF۱ (Insulin-like growth factor۱) پلاسما

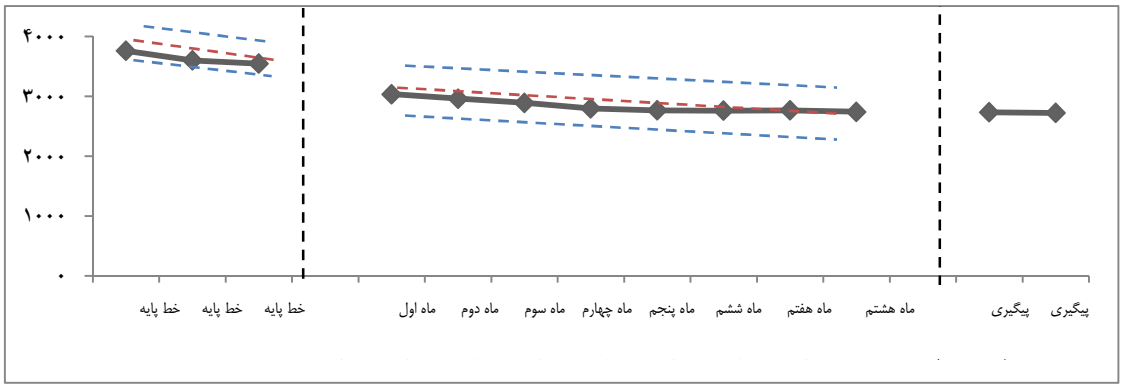
درون موقعیتی					بین موقعیت‌ها		
توالی موقعیت	A		B		مقایسه‌ی موقعیت	B A	
آزمودنی‌ها	اول	دوم	اول	دوم	آزمودنی	اول	دوم
طول موقعیت‌ها	۳	۵	۸	۸		تغییرات روند	
سطح					تغییر جهت		
میانه	۳۷۰	۳۶۵	۱۵۹	۲۸۲	اثر وابسته به هدف	منفی	منفی
میانگین	۳۶۷.۴	۳۶۵.۴	۱۶۰	۲۷۱	تغییر ثبات	باثبات به باثبات	باثبات به باثبات
دامنه‌ی تغییرات	۳۵۰-۳۸۲	۳۶۰-۳۷۰	۱۲۰-۲۱۰	۱۸۶-۳۴۵		تغییر در سطح	
دامنه‌ی تغییرات محفظه ثبات	باثبات	باثبات	بی‌ثبات	بی‌ثبات	تغییر نسبی	۱۲۹ به ۳۸۲	۳۲۱ به ۳۸۲
تغییر سطح					تغییر مطلق	۲۱۰ به ۳۸۲	۳۴۵ به ۳۷۰
تغییر نسبی	۳۶۰-۳۸۲۰۲	۳۶۲-۳۶۹۰۵	۱۲۹۰۵-۱۸۹۰۵	۲۱۴-۳۲۱	تغییر میانه	۱۵۹ به ۳۷۰	۲۸۲ به ۳۶۵
تغییر مطلق	۳۵۰-۳۸۲	۳۶۰-۳۷۰	۱۲۰-۲۱۰	۱۸۶-۳۴۵	تغییر میانگین	۱۶۱ به ۳۶۷	۲۷۱ به ۳۶۵
روند						همپوشی‌ها	
جهت	نزولی	نزولی	نزولی	نزولی	PND	٪۱۰۰	٪۱۰۰
ثبات	باثبات	باثبات	باثبات	باثبات	POD	٪۰	٪۰
مسیرهای چندگانه	خیر	خیر	خیر	خیر			

POD: Percentage of overlapping data; PND: Percentage of non-overlapping data

ترسیم خط میانه ومحفظه‌ی ثبات برای نمودار داده‌های IGFBP3/SH (Insulin-like growth factor binding protein۳)

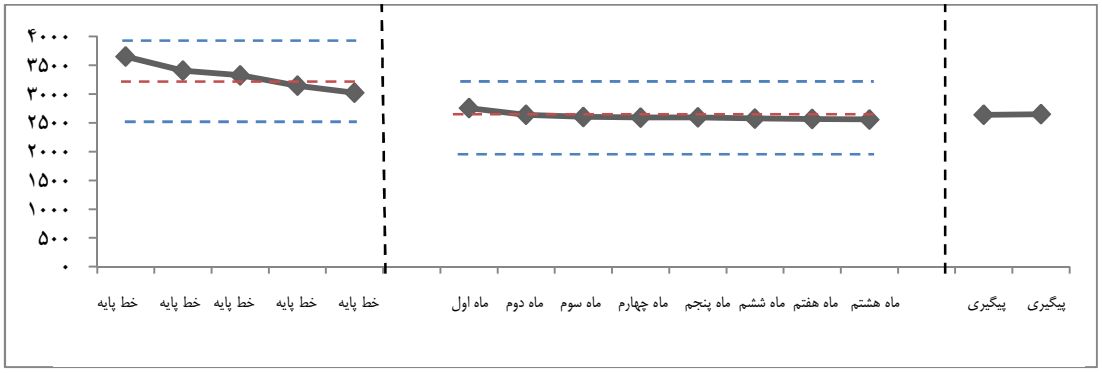


ترسیم خط روند ومحفظه‌ی ثبات برای نمودار داده‌های IGFBP3/SH

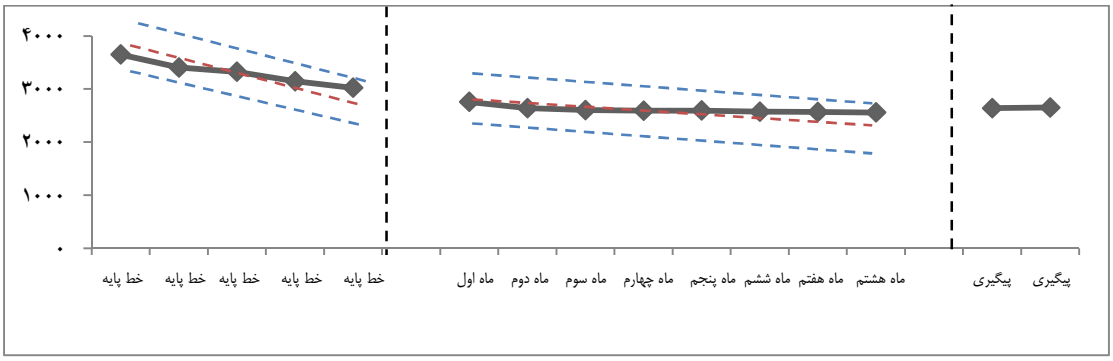


شکل ۸. خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آزمودنی اول (ش- ص)

ترسیم خط میانه و محفظه‌ی ثبات برای نمودار داده‌های IGFBP3/F (Insulin-like growth factor binding protein۳)



ترسیم خط روند و محفظه‌ی ثبات برای نمودار داده‌های IGFBP3/F



شکل ۹. خط میانه، خط روند و محفظه‌ی ثبات آزمودنی دوم (ف- ط)

جدول ۵. متغیرهای تحلیل دیداری درون موقعیتی و بین موقعیتی برای دو آزمودنی در Insulin-like growth factor binding protein ۳ (IGFBP۳)

درون موقعیتی					بین موقعیت‌ها		
توالی موقعیت	A		B		مقایسه‌ی موقعیت	B A	
آزمودنی‌ها	اول	دوم	اول	دوم	آزمودنی	اول	دوم
طول موقعیت‌ها	۳	۵	۸	۸		تغییرات روند	
سطح					تغییر جهت		
میانه	۳۵۹۹	۳۳۲۵	۲۷۸۱	۲۵۹۱	اثر وابسته به هدف	منفی	منفی
میانگین	۳۶۳۵	۳۳۰۹	۲۸۳۸	۲۶۱۰	تغییر ثبات	باثبات به باثبات	باثبات به باثبات
دامنه‌ی تغییرات	۳۵۴۶-۳۷۶۰	۳۰۲۳-۳۶۵۰	۲۷۴۰-۳۰۳۵	۲۵۵۸-۲۷۵۶	تغییر در سطح		
دامنه‌ی تغییرات محفظه‌ی ثبات	باثبات	باثبات	باثبات	باثبات	تغییر نسبی	۲۶۲۴ به ۳۵۴۶	۲۶۲۱ به ۳۱۴۵
تغییر سطح					تغییر مطلق	۳۰۳۵ به ۳۷۶۰	۲۷۵۶ به ۳۶۵۰
تغییر نسبی	۳۵۴۶-۳۷۶۰	۳۱۴۵-۳۵۲۷	۲۶۴۲-۲۹۲۴	۲۴۱۰-۲۶۲۱	تغییر میانه	۲۷۸۱ به ۳۵۹۹	۲۵۹۱ به ۳۳۲۵
تغییرمطلق	۳۵۴۶-۳۷۶۰	۳۰۲۳-۳۶۵۰	۲۷۴۰-۳۰۳۵	۲۵۵۸-۲۷۵۶	تغییر میانگین	۲۸۳۸ به ۳۶۳۵	۲۶۱۰ به ۳۳۰۹
روند						همپوشی‌ها	
جهت	نزولی	نزولی	هم‌سطح	هم‌سطح	PND	٪۱۰۰	٪۱۰۰
ثبات	باثبات	باثبات	باثبات	باثبات	POD	٪۰	٪۰
مسیرهای چندگانه	خیر	خیر	خیر	خیر			

POD: Percentage of overlapping data; PND: Percentage of non-overlapping data

بحث

افـزایش عوامـل رشـدی و آنابولیـک بـرای کـاهش هایپرمتابولیسم و کاتابولیسم عضلانی به منظور تسریع در تـرمیم عضـلات از دسـت رفتـه، بهبـود سـریع جراحت‌ها و کـاهش نـاراحتی‌هـا و دردهـای پـس از سوختگی شدید، بدون استفاده از عمل هـای جراحـی پرهزینـه و متعـدد از اهـداف روش‌هـای درمـانی سوختگی است.

جداول ۱ و ۲ داده‌های آزمودنی‌ها را قبـل و پـس اجرای مداخله نشان می‌دهد و در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نیز این داده ها به صورت مصور قابل مشـاهده اسـت. نتـایج پـژوهش حاضـر نشـان داد کـه ۸ مـاه تمـرین مقـاومتی باعـث افـزایش سـطوح در گـردش GH در افراد مبتلا به سوختگی شدید شده است، اما افزایشـی در سطوح IGF۱ و IGFBP۳ مشاهده نشد.

طبق شکل‌هـای ۴ و ۵ نقـاط خـط پایـه، رونـدی نزولی و ثابـت در GH پلاسـمای دو آزمـودنی نشـان داده است. با شروع تمرین ها، تغییر زیـادی در ۴ مـاه اول در سطح و روند (طبـق شـاخص تغییـر سـطح و تغییر روند) نمرات ایجاد نشد؛ امـا پـس از آن رونـد، صعودی شد. روند نمرات از نزولی به صعودی تغییـر یافت که این نشان دهنده‌ی اثربخشی تمـرین بـر GH پلاسمای این افراد بوده است.

همان‌گونه که در جـدول ۳ آمـده اسـت، میـانگین نمرات GH از ۰/۱۶ در خط پایه به ۰/۸۷ در مداخلـه در آزمودنی اول و از ۰/۳ به ۱/۰۲ در مداخله رسـیده است که نشان دهنده‌ی افزایش سطوح GH در این دو آزمودنی شده است. همچنـین شـاخص PND نشـان می دهد که همپوشی بین نقاط خط پایه و مداخلـه در آزمـودنی اول ۰/۲۵ و در آزمـودنی دوم ۰/۱۳ بـوده است و مداخله در اولین آزمودنی ۰/۷۵ و در دومـین آزمودنی ۰/۸۷ مؤثر بوده است.

مطـابق نتـایج مطالعـه‌ی Aili Low و همکـاران (۱۱)، کاهش GH در گردش پس از سـوختگی ادامـه می‌یابد که با یافته‌های تحقیق حاضـر در خـط پایـه‌ی آزمودنی‌هـا همخـوانی دارد و ایـن کـاهش، حتـی در موقعیت مداخله با انجام تمرین‌ها در ماه‌هـای اول بـه چشم مـی‌خـورد. طبـق نتـایج مطالعـه‌ی Kraemer و Ratamess تمـرین مقـاومتی باعـث افـزایش GH در افراد سالم می‌شود (۲۴) که با نتـایج پـژوهش حاضـر در افـراد سـوخته همخـوانی دارد و افـزایش GH در گردش ۴ ماه پس از انجام تمرین ها شروع شده است؛ احتمال می‌رود در ۴ ماه ابتـدایی مداخلـه، شـرکت در تمرین های مقاومتی از کاهش بیشتر و مداوم GH پس از سوختگی جلوگیری کرده است.

تزریق GH به تنهایی موجب افـزایش ۲۰ برابـری در تولید IGF۱ mRNA در عضله ی اسـکلتی نسـبت بـه تزریـق IGF۱ بـه تنهـایی (افـزایش ۲/۵ برابـری) می‌شود که ممکـن اسـت مربـوط بـه مکـانیزم تنظـیم تراکم عضله‌ی اسـکلتی باشـد؛ زیـرا افـزایش سـطوح اتوکرین/ پاراکرین IGF۱ نشان می دهد که مهـم‌تـر از سیسـتم IGF۱ در گـردش اسـت (۸). بنـابراین، در مطالعه ی حاضر نیز افزایش GH ممکن است موجـب افـزایش IGF۱ درون عضـلانی و در نتیجـه، افـزایش سـنتز پـروتئین در عضـلاتی کـه مـورد تمـرین قـرار گرفته‌اند شود. اما از محدودیت‌های ایـن تحقیـق ایـن است که تغییرات IGF۱ عضلانی بررسی نشد.

پـرداختن بـه فعالیـت بـدنی باعـث ترشـح GH می شود که از طریق خون بـه کبـد و سـایر بافـت هـا می رود و تولید IGF۱ را امکان پذیر می سـازد. IGF۱

نیز اثر آنابولیکی خود را به طور مستقیم روی بافت‌های گوناگون اعمال می‌کند (۳۰).

GH به عنوان یک میتوژن برای فیبروبلاست شناخته شده است. افزایش تحریک فیبروبلاست می‌تواند به طور بالقوه باعث شکل گرفتن بیشتر آن شود و منجر به التیام اثر زخم در سوختگی گردد. اثر زخم بعد از ۴-۲ سال پس از سوختگی، کاهش معنی‌داری نشان داد. بر اساس گزارش یک پژوهش، ۲۴-۱۲ ساعت پس از درمان با IGF۱ مشاهده شد که مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیال در زخم، ۲/۵-۲/۰ برابر افزایش یافته است (۲۱).

در مطالعات صادقی بروجردی و رحیمی (۲۸) و مرندی و همکاران (۳۰) افزایش معنی‌داری در GH پس از یک جلسه تمرین مشاهده شده است که می توان نتیجه گرفت که GH در پاسخ به تمرین مقاومتی که شدت لازم را اعمال کرده باشد، افزایش می‌یابد.

طبق شکل‌های ۶ و ۷ نقاط خط پایه‌ی IGF۱ پلاسما در آزمودنی اول روندی نزولی و در آزمودنی دوم روندی ثابت داشته است؛ با شروع تمرین باز هم روند نزولی برای دو آزمودنی مشاهده می‌شود (طبق شاخص تغییر سطح و تغییر روند). روند نمرات از نزولی به نزولی بوده است؛ که این نشان دهنده‌ی عدم اثربخشی تمرین بر IGF۱ پلاسمای این افراد بوده است. همان گونه که در جدول ۴ آمده است، میانگین نمرات IGF۱ از ۳۶۷/۴ در خط پایه به ۱۶۰/۸ در مداخله‌ی آزمودنی اول و از ۳۶۵/۴ به ۲۷۰/۷۵ در مداخله‌ی آزمودنی دوم رسیده است، که نشان دهنده‌ی کاهش سطح IGF۱ در این دو آزمودنی است. همچنین شاخص PND نشان می‌دهد که عدم همپوشی بین نقاط خط پایه و مداخله در هر دو آزمودنی ۱۰۰ درصد بوده، اما اثر مداخله در دو آزمودنی در جهت هدف نبوده است.

طبق شکل های ۸ و ۹ نقاط خط پایه ی IGFBP۳ پلاسما، روندی نزولی برای دو آزمودنی داشته است؛ با شروع تمرین در ابتدا روند نزولی برای دو آزمودنی مشاهده می شود (طبق شاخص تغییر سطح و تغییر روند)؛ اما پس از آن روند به صورت ثابت ادامه یافته است. روند نمرات از نزولی به هم سطح بوده است؛ که این نشان دهنده ی اثربخشی تمرین بر سطح IGFBP۳ پلاسمای این افراد بوده است. شاید تمرین ها از روند نزولی IGFBP۳ وکاهش بیش از حد آن جلوگیری کرده است.

همان گونه که در جدول ۵ آمده است، میانگین نمرات IGFBP۳ از ۳۶۳۵ در خط پایه به ۲۸۳۸/۷ در مداخله‌ی آزمودنی اول و از ۳۳۰۹/۶ به ۲۶۱۰ در مداخله‌ی آزمودنی دوم رسیده است، که نشان دهنده ی کاهش سطح IGFBP۳ در این دو آزمودنی شده است. همچنین شاخص PND نشان می دهد که عدم همپوشی بین نقاط خط پایه و مداخله در هر دو آزمودنی ۱۰۰ درصد بوده است؛ اما مداخله در دو آزمودنی در خلاف جهت درمان پیش رفته است. احتمال می رود چون IGFBP۳ یک واسطه برای اعمال IGF۱ می باشد، سطوح در گردش IGF۱ با تبدیل بیشتر به IGFBP۳ برای ایجاد آثار آنابولیک عضلانی کاهش یافته است و تمرین ها اگر چه باعث افزایش معنی دار در سطح IGFBP۳ در گردش نشده است؛ اما ممکن است از روند نزولی آن نسبت به خط پایه جلوگیری کرده باشد.

کاهش مقدار IGF۱ و IGFBP۳ پلاسما نیز طبق گزارش های مختلف (۱۴، ۳)، پس از سوختگی در

بیماران وجود دارد که این کاهش در خط پایه ی آزمودنی های این مطالعه وجود داشت. سطوح کم IGFBP۳ در بیمارانی که GH ندارند، ممکن است باعث نیمه ی عمر کوتاه تر IGF۱ و کاهش اثرات القای پروتئین شود (۸). افزایش در سطوح IGF۱ و IGFBP۳ پس از تمرین مقاومتی در مردان و زنان مشاهده شده است؛ اما در مطالعه‌ای دیگر، کاهش IGFBP۳، بدون هیچ تفاوتی در سطوح پایه‌ی IGF۱ و IGFBP۳ قبل و پس از انجام تمرین ها مشاهده شده است (۲۰).

در همین راستا، مطالعات دیگر نیز تفاوتی در IGF۱ و IGFBP۳ را در نتیجه‌ی انجام تمرین‌های متفاوت با آزمودنی های مختلف نشان نداده اند (۲۰). بر این اساس، افزایش ۱۲ درصدی در IGF۱ و ۲۰ درصدی در IGFBP۳ در طول ۴ ماه تمرین در دوچرخه سواران مشاهده شد، اما در افراد غیر فعال همتا این گونه نبود. همچنین، افزایش غلظت IGF۱ را بیشتر از ۷۶ درصد و IGFBP۳ را از ۹۰-۳۰ درصد در شناگران دانشگاهی بعد از ۴ ماه تمرین استقامتی نشان دادند (۲۰).

در مقابل این مطالعات، تعدادی از محققان افزایش در IGF۱ و IGFBP۳ را پس از تمرین استقامتی یا مقاومتی مشاهده نکردند. این مطالعات در رابطه با آزمودنی‌ها و پروتکل مورد استفاده در هر مطالعه متفاوت بوده است. همچنین بسیاری از مطالعات مرتبط با IGF۱ انرژی دریافتی را کنترل نکردند؛ در صورتی که اثر آن روی غلظت سرم IGF۱ و $IGFBP_S$ نشان داده شده است. بنابراین ممکن است یک آستانه ای برای مشاهده ی تغییر در غلظت IGF۱ سرم لازم باشد (۲۰). به هر حال، سطوح IGF۱ و IGFBP۳ توسط GH تنظیم می گردد و باعث افزایش سنتز پروتئین می‌شود (۲۲).

طبق نتایج پژوهش حاضر به نظر می رسد تمرین مقاومتی بتواند باعث افزایش تولید IGF۱ در عضلات درگیر در تمرین ها شود و سنتز پروتئین عضلانی را افزایش دهد. همچنین به دلیل افزایش هورمون‌های کاتابولیکی و هایپرمتابولیسم پس از سوختگی شدید، ممکن است تمرین‌ها موجب کاهش سطوح هورمون‌های کاتابولیک شود که اندازه‌گیری آن در تحقیقات آینده توصیه می‌شود.

از آن جایی که نمونه گیری خونی در صبح و در حالت ناشتا بود، با توجه به این که IGF۱ و IGFBP۳ در گردش پلاسما در طول شبانه روز متغیر است و به دنبال گرسنگی های طولانی کاهش می یابد، شاید کاهش IGF۱ و IGFBP۳ در این مطالعه در طول انجام تمرین‌ها، به علت زمان نمونه‌گیری باشد که می تواند به عنوان یک متغیر اثرگذار در تحقیقات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

همچنین در مطالعات مختلف با شدت‌ها و حجم‌های متفاوت، تمرین‌های پاسخ IGF۱ و IGFBP۳ به تمرین در آزمودنی های مختلف، متفاوت بوده است؛ در نتیجه، ممکن است کاهش سطوح IGF۱ در آزمودنی های پژوهش به خاطر بیماری و شرایط خاص آن‌ها باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از بیمارستان سوانح سوختگی شهر اصفهان به ویژه بخش فیزیوتراپی و آزمایشگاه بیمارستان که همکاری‌های کافی و لازم را در تمام طول طرح مبذول داشتند.

References

1. Wiliams C. Assessment and management of pediatric burn injuries. Nurs Stand 2011; 25(25): 60-8.
2. Balasubramaniam A, Wood S, Joshi R, Su C, Friend LA, Sheriff S, et al. Ghrelin stimulates food intake and growth hormone release in rats with thermal injury: synthesis of ghrelin. Peptides 2006; 27(7): 1624-31.
3. Jeschke MG, Chinkes DL, Finnerty CC, Kulp G, Suman OE, Norbury WB, et al. Pathophysiologic response to severe burn injury. Ann Surg 2008; 248(3): 387-401.
4. Demling RH. Comparison of the anabolic effects and complications of human growth hormone and the testosterone analog, oxandrolone, after severe burn injury. Burns 1999; 25(3): 215-21.
5. Mlcak RP, Suman OE, Murphy K, Herndon DN. Effects of growth hormone on anthropometric measurements and cardiac function in children with thermal injury. Burns 2005; 31(1): 60-6.
6. Ormsbee M, Clapper JA, Clapper J, Vukovich MD. Moderate changes in energy balance combined with exercise do not alter insulin-like growth factor I or insulin-like growth factor binding protein 3. Nutrition Research 2006; 26(9): 467-73.
7. Newsome TW, Mason AD, Pruitt BA. Weight loss following thermal injury. Ann Surg 1973; 178(2): 215-7.
8. Edelman LS, McNaught T, Chan GM, Morris SE. Sustained bone mineral density changes after burn injury. J Surg Res 2003; 114(2): 172-8.
9. Suman OE, Herndon DN. Effects of cessation of a structured and supervised exercise conditioning program on lean mass and muscle strength in severely burned children. Arch Phys Med Rehabil 2007; 88(12 Suppl 2): S24-S29.
10. Yasuhara S, Kaneki M, Sugita H, Sugita M, Asai A, Sahani N, et al. Adipocyte apoptosis after burn injury is associated with altered fat metabolism. J Burn Care Res 2006; 27(3): 367-76.
11. Aili Low JF, Barrow RE, Mittendorfer B, Jeschke MG, Chinkes DL, Herndon DN. The effect of short-term growth hormone treatment on growth and energy expenditure in burned children. Burns 2001; 27(5): 447-52.
12. Low JF, Herndon DN, Barrow RE. Effect of growth hormone on growth delay in burned children: a 3-year follow-up study. Lancet 1999; 354(9192): 1789.
13. Krogh J, Nordentoft M, Mohammad-Nezhad M, Westrin A. Growth hormone, prolactin and cortisol response to exercise in patients with depression. J Affect Disord 2010; 125(1-3): 189-97.
14. Lang Ch, Nystrom GJ, Frost RA. Burn-induced changes in IGF-I and IGF-binding proteins are partially glucocorticoid dependent. Am J Physiol 2002; 51(1): 207-15.
15. Tarpenning KM, Wiswell RA, Hawkins SA, Marcell TJ. Influence of weight training exercise and modification of hormonal response on skeletal muscle growth. J Sci Med Sport 2001; 4(4): 431-46.
16. Velloso CP. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. Br J Pharmacol 2008; 154(3): 557-68.
17. De Palo EF, Gatti R, Lancerin F, Cappellin E, Spinella P. Correlations of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I): effects of exercise and abuse by athletes. Clin Chim Acta 2001; 305(1-2): 1-17.
18. Aleman A, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. Prog Neurobiol 2009; 89(3): 256-65.
19. Suetta Ch, Clemmensen C, Andersen JL, Magnusson SP, Schjerling P, Kjaer M. Coordinated increase in skeletal muscle fiber area and expression of IGF-I with resistance exercise in elderly post-operative patients. Growth Horm IGF Res 2010; 20(2): 134-40.
20. Wahl P, Zinner C, Achtzehn S, Bloch W, Mester J. Effect of high- and low-intensity exercise and metabolic acidosis on levels of GH, IGF-I, IGFBP-3 and cortisol. Growth Horm IGF Res 2010; 20(5): 380-5.
21. Lal SO, Wolf SE, Herndon DN. Growth hormone, burns and tissue healing. Growth Horm IGF Res 2000; 1(Suppl B): S39-S43.
22. Fang CH, Li BG, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO. Treatment of burned rats with insulin-like growth factor I inhibits the catabolic response in skeletal muscle. Am J Physiol 1998; 275(4 Pt 2): R1091-R1098.
23. Fukushima R, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Inaba T, Han I, et al. Prophylactic treatment with growth hormone and insulin-like growth factor I improve systemic bacterial clearance and survival in a murine model of burn-induced gut-derived sepsis. Burns 1999; 25(5): 425-30.
24. Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med 2005; 35(4): 339-61.
25. Stokes K. Growth hormone responses to sub-maximal and sprint exercise. Growth Horm IGF Res 2003; 13(5): 225-38.
26. Gharakhanlou R, Saremi A, Omidfar K, Sharghi S, Gheraati MR. The effect of resistance training on myostatin, GASP1, IGF1 and

IGFBP3 serum Levels in young man. Journal of Movement Science and Sports 2009; 7(13): 67-80. [In Persian].
27. Ben OO, Elloumi M, Zouhal H, Makni E, Denguezli M, Amri M, et al. Effect of individualized exercise training combined with diet restriction on inflammatory markers and IGF-1/IGFBP-3 in obese children. Ann Nutr Metab 2010; 56(4): 260-6.
28. Sadeghi-Boroujerdi S, Rahimi R. GH and IGF-1 hormone response to the fierce resistance of two different volume resting between sets. Olympic 2009; 17(1): 57-68. [In Persian].
29. Rajabi H, Razmjo S, Jannati M, Zarifi I. Response relationship of insulin-like growth factor and creatine kinase after a six-week session, and resistance training pyramid and reverse pyramid of athletic girls. Olympic 2010; 18(2): 29-42. [In Persian].
30. Marandi M, Mohebi H, Gharakhanlo R, Naderi Gh. Reactions IGFBPS, IGF1, GH and testosterone in a strenuous physical activity sessions. Olympic 2004; 12(4): 7-15. [In Persian].
31. Alloju SM, Herndon DN, McEntire SJ, Suman OE. Assessment of muscle function in severely burned children. Burns 2008; 34(4): 452-9.
32. Melchert-McKearnan K, Deitz J, Engel JM, White O. Children with burn injuries: purposeful activity versus rote exercise. Am J Occup Ther 2000; 54(4): 381-90.
33. Farahani H, Abedi A, Aghamohammadi S, Kazemi S. Single subject researches methodology in behavioral sciences and medicine (approach-applied). Tehran, Iran: Danjeh Publication; 2010. [In Persian].

Journal of Isfahan Medical School Received: 25.01.2014

Vol. 32, No. 279, 4th Week, May 2014 Accepted: 09.04.2014

The Effect of Eight Months of Resistive Training on Growth hormone, Insulin-Like Growth Factor1 and Insulin-like Growth Factor Binding Protein3 Plasma Levels in Patients with Severe Burns

Nasim Behzadnezhad MSc[1], Sayyed Mohammad Marandi PhD[2], Fahimeh Esfarjani PhD[3], Ahmad Abedi PhD[4], Fereshteh Bardia MSc[1]

Original Article

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the effect of eight months of resistive training on growth hormone (GH), insulin-like growth factor1 (IGF1), and insulin-like growth factor binding protein3 (IGFBP3) plasma levels in patients with severe burns.

Methods: The research method used in this study was of the individual-case type with multiple base lines for the participants. The examinees of this study included two women with severe burns (third degree) in the age range of 20 to 30 years confined in the Central Accidents and Burns Hospital, Isfahan, Iran. After determining the base-line position, the participants were entered into the project in a ladder step-by-step format. During the 8 months of individual intervention, they did the resistive training and one month after the finishing of the intervention period, they were put under follow-up examinations for 2 months. The measuring tool for this study was the blood tests taken for measuring GH, IGF1, and IGFBP3 plasma levels, which were taken at the fasting morning time and 24 hours after the exercises at the end of each month.

Findings: Based on the visual analysis and descriptive statistical indexes, the resistive training in both examinees had caused a significant change in the GH, IGF1 and IGFBP3 plasma levels; as the percentage of non-overlapping data (PND) was 75% for the first and 87.5% for the second examinee in GH level, and 100% for both examinees in IGF1 and IGFBBP3 levels.

Conclusion: It seems that long-term resistive training can cause elevation of the plasma level of some growth factors in patients with severe burns or it can prevent the reverse process and intense decline in these factors after the burn takes place. In addition, it would make these patients become free of the need for frequent surgeries and using different equipments.

Keywords: Burn, Growth hormone (GH), Insulin-like growth factor1 (IGF1), Insulin-like growth factor binding protein3 (IGFBP3), Resistive exercise, Single subject research

Citation: Behzadnezhad N, MarandI SM, Esfarjani F, AbedI A, Bardia F. **The Effect of Eight Months of Resistive Training on Growth hormone, Insulin-Like Growth Factor1 and Insulin-like Growth Factor Binding Protein3 Plasma Levels in Patients with Severe Burns.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(279): 388-407

1- Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Psychology of Exceptional Children, School of Education Sciences and Psychology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Nasim Behzadnezhad MSc, Email: nasrin_behzadnezhad@yahoo.com

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۹/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۱۶

نقش ریز مغذی‌ها در فعالیت بیماری آرتریت روماتوئید

دکتر سپیده حجازی[۱]، دکتر کامیلا هاشم‌زاده[۲]، دکتر مریم صاحباری[۱]

مقاله مروری

چکیده

مقدمه: آرتریت روماتوئید یک بیماری اتوایمیون با علت ناشناخته است. عوامل اتیولوژیک متعددی در پاتوژنز این بیماری مؤثرند که به طور معمول ناشی از عوامل التهابی می‌باشند. ریز مغذی‌ها شامل روی مس سلنیوم از اجزای اساسی آنزیم‌ها در مسیر اکسیداتیو هستند که نقش اساسی در پیشگیری از استرس‌های اکسیداتیو سلولی ناشی از سوپر اکسیدازها و رادیکال‌های آزاد دارند. این مطالعه به بررسی رابطه‌ی سطح سرمی این اجزا با فعالیت آرتریت روماتوئید پرداخت.

روش‌ها: این مطالعه به بررسی رابطه‌ی سطح سرمی ریزمغذی‌ها با فعالیت آرتریت روماتوئید پرداخته است. بدین منظور جست وجوی الکترونیکی مقالات در پایگاه‌های اطلاعاتی با کلید واژه‌های مرتبط و بدون محدودیت زمانی صورت گرفت.

یافته‌ها: سطح سرمی سلنیوم روی و نسبت روی به مس در بیماران آرتریت روماتوئید نسبت به افراد هم‌سن و هم‌جنس سالم پایین‌تر بود؛ اما میزان سطح سرمی روی یک ارتباط مثبت با میزان آلبومین سرم و یک ارتباط منفی با مدت زمان بیماری داشت. همچنین میزان مس سرم ارتباط مثبتی با فعالیت بیماری داشت، اما ارتباطی بین سطح سرمی مس با سن و جنس وجود نداشت. همچنین بین سطح سرمی پایین سلنیوم با تعداد مفاصل درگیر ارتباط وجود داشت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ذخیره‌ی عناصر کمیاب در بدن با ابتلا به آرتریت روماتوئید و فعالیت بیماری در ارتباط باشد.

واژگان کلیدی: آرتریت روماتویید، DAS28، سلنیوم، روی، مس، نسبت روی به مس، آلبومین، سرولوپلاسمین، عناصر کمیاب

ارجاع: حجازی سپیده، هاشم‌زاده کامیلا، صاحباری مریم. **نقش ریز مغذی‌ها در فعالیت بیماری آرتریت روماتوئید.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۹): ۴۱۵-۴۰۸

مقدمه

بیماری آرتریت روماتوئید یکی از شایع‌ترین بیماری‌های خودایمنی مزمن است که ۱-۰/۵ درصد جمعیت بزرگسال جهان را درگیر کرده است (۱). درمان زودرس بیماری آرتریت روماتوئید، هم جهت جلوگیری از تخریب غیر قابل برگشت مفاصل و هم جهت بهبود پیش‌آگهی بیماری ضروری است (۲).

عوامل متعددی در بیماری‌زایی آن نقش دارند. عناصر کمیاب سلنیوم، روی و مس اجزای چندین آنزیم بنیادی در مسیرهای اکسیداتیو می‌باشند که نقش محوری در جلوگیری از استرس اکسیداتیو سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد و سوپراکسیدها دارند. اهمیت عناصر کمیاب در بیماری‌های التهابی مزمن مرتبط با عوامل عملکرد سیستم ایمنی و متابولیک

۱- استادیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲- روماتولوژیست، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مریم صاحباری
Email: sahebarim@mums.ac.ir

مختلف در مفاصل می‌باشد که ضرورت بررسی این عناصر در بیماری‌های التهابی از جمله آرتریت روماتوئید را ایجاد می‌کند (۳).

این مقاله‌ی مروری به مقایسه‌ی مطالعات مختلف در این خصوص می‌پردازد تا مشخص شود آیا ارتباطی بین سطح سرمی مس، روی، سلنیوم، سرولوپلاسمین و آلبومین با فعالیت بیماری روماتوئید آرتریت وجود دارد و آیا تفاوتی در سطوح سرمی عناصر کمیاب در بیماران مبتلا به روماتوئید آرتریت در مقایسه با افراد سالم وجود دارد.

روش‌ها

جستجوی الکترونیکی مقالات انگلیسی و فارسی در پایگاه‌های اطلاعاتی Scopus، Pub Med، SID و Google scholar با ترکیبات مختلفی از کلید واژه‌های مرتبط و بدون محدودیت زمانی صورت گرفت. برای بالا بردن حساسیت در جستجو از کلمات کلیدی آرتریت روماتوئید، DAS۲۸، سلنیوم، روی، مس و سرولوپلاسمین و عناصر کمیاب و معادل انگلیسی آن‌ها (منطبق بر Mesh) استفاده گردید. در ابتدا، لیستی از عناوین و چکیده‌ی مقالات موجود در پایگاه‌های مورد بررسی تهیه و سپس بر اساس معیارهای ورود، وارد مطالعه شدند. معیار ورود به مطالعه شامل مطالعاتی بود که بر روی بیماران مبتلا به بیماری آرتریت روماتوئید صورت گرفته بود و به بررسی سطوح سرمی عناصر کمیاب در آن‌ها پرداخته بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل تحقیقات انجام شده بر روی افراد زیر ۱۸ سال و دارا بودن سایر بیماری‌های خود ایمنی و مطالعات غیر مرتبط با سؤال پژوهش بودند.

یافته‌ها

ریز مغذی‌ها به عنوان مواد معدنی تعریف می‌شوند که به میزان ۱۰۰-۱ میلی‌گرم در روز در بالغین مورد نیازند و کمتر از ۰/۰۱ درصد از وزن کلی بدن را در بر می‌گیرند که شامل آهن، روی، مس و منگنز، فلوراید و سلنیوم می‌باشند که محتوای این ریز مغذی‌ها در طی مسیر بیشتر التهاب‌ها و عفونت‌ها تغییر می‌کند. البته هنوز به طور قطعی مشخص نشده است که این تغییرات، به علت تغذیه‌ی ناکافی است یا به علت عدم تعادل بین پاسخ التهابی ارگان‌هایی که توسط سیتوکین‌ها تنظیم می‌شود (۴).

مس

مس نقش مهمی در ساختمان بسیاری از آنزیم‌های بدن دارد. کمبود مس شامل علایمی از جمله خستگی، شکل غیر طبیعی مو، دپیگمانتاسیون پوست، ضعف عضلانی و اختلالات عصبی، ادم و بزرگی کبد و طحال، پوکی استخوان و تظاهرات خونی کمبود مس مانند آنمی میکروسیتیک، نوتروپنی و ترومبوسیتوپنی می‌شود (۵). به طور تقریبی در همه‌ی مطالعاتی که به بررسی سطح سرمی مس در بیماران آرتریت روماتوئید پرداخته‌اند، افزایش مشخص در سطح سرمی مس در گروه مورد در مقایسه با شاهد مشاهده شده است (۱۰-۳)؛ به استثنای مطالعه‌ی علا و همکاران که سطح سرمی مس بین گروه مورد و شاهد تفاوت آماری معنی‌دار نداشت (P = ۰/۱۵) (۱۱).

افزایش ساخت واکنشگرهای فاز حاد در جریان التهاب، شاید توضیح دهنده‌ی افزایش مس در بیماران آرتریت روماتوئیدی باشد. مس، نقش مهمی در عملکرد بسیاری از آنزیم‌ها ایفا می‌کند و کمبود آن می‌تواند سبب اختلال عملکرد آنزیم‌های پراکسیداز و

کاتالاز شود. به نظر می‌رسد که مس به عنوان یک عامل نشان دهنده‌ی التهاب در بدن، یا به علت آزادسازی بیشتر مس از کبد یا تغییر نسبت مس باند نشده به سرولوپلاسمین و مس باند شده به سرولوپلاسمین عمل کند (۱۲).

در مطالعات متعدد افزایش سطح سرمی مس با فعالیت بیماری ارتباط مثبتی داشته است و مس را به عنوان نشانگر فعالیت بیماری مطرح کرده‌اند (۱۲) و به ویژه ESR (Erythrocyte sedimentation rate) و افزایش سطح سرمی مس با تعداد مفاصل دردناک نیز ارتباط مستقیم دارد. سطح سرمی مس در گروه‌های سنی مختلف تفاوت معنی‌داری ندارد (۷) و همچنین ارتباطی با مدت بیماری و جنسیت وجود ندارد (۱۳).

روی

روی یک عنصر حیاتی برای استحکام بخشیدن ساختمان غشای سلولی و عملکرد آن با اثر آنتی اکسیدانی است که غشای سلولی را از لیپیدهای غیر اشباع و سیتوکین‌های التهابی محافظت می‌کند. پایین بودن سطح سرمی روی در بیماران آرتریت روماتوئید مطرح کننده‌ی ارتباط معکوس بین سطح سرمی روی و عوامل التهابی است. البته دریافت روزانه‌ی این عناصر در رژیم غذایی نیز مؤثر است (۸) و با توجه به اثبات پایین بودن روی در بیماران در اکثر مطالعات، می‌توان مکمل‌های روی را به عنوان قسمتی از درمان بیماران آرتریت روماتوئید در نظر گرفت که نیاز به تحقیقات بیشتر را می‌طلبد. مصرف مکمل‌های روی به همراه رژیم غنی از سبزیجات و میوه‌جات ممکن است اثر پیشگیری کننده از آرتریت روماتوئید داشته باشد (۹). در بررسی‌های انجام شده همبستگی بین سطح سرمی روی و عدد DAS (Differential ability scales) و متغیرهای وابسته به DAS یافت نشد. بنابراین سطح سرمی روی معیار مناسبی برای تعیین شدت بیماری نمی‌باشد، اما رابطه‌ی معکوس با مدت بیماری می‌تواند داشته باشد (۱۰). تغییرات در سطح سرمی روی در بیماری آرتریت روماتوئید می‌تواند نشانه‌ای از تغییرات در مدیاتورهای لوکوسیت‌ها باشد (LEM یا Leukocyte endogenous mediator). از طرفی، ۶۰ درصد روی به آلبومین و درصد کمی نیز به آمینواسیدها به خصوص هیستیدین باند می‌شود و سطح پایین سرمی روی در بیماران آرتریت روماتوئید می‌تواند مرتبط با افزایش سطح گلوبولین و کاهش سطح آلبومین باشد و از این رو، مطرح کننده‌ی این است که سطح سرمی روی ارتباط معنی‌داری با سطح سرمی آلبومین در بیماران آرتریت روماتوئید دارد و درمان‌های ضد التهابی شاید در افزایش سطح سرمی روی مؤثر باشند (۱۰).

نسبت روی به مس

نسبت روی به مس در برخی از مطالعات گذشته بررسی شده است و ارتباط این نسبت با بیماری RA (Rheumatoid Arthritis) اثبات شده است (۱۱). اکثر مطالعات کاهش سطح سرمی روی به مس را نشان داده‌اند. این مسأله می‌تواند ناشی از کاهش روی یا افزایش سطح سرمی مس و یا هر دو عامل در افراد تحت مطالعه باشد (۱۴). در مطالعه‌ی Mazzetti و همکاران بین نسبت روی به مس و سطح عامل روماتوئید رابطه‌ی معکوس وجود داشت (۱۵). مطالعات بر وجود رابطه بین تغییر نسبت روی به مس و آترواسکلروز زودرس در افراد تأکید نموده‌اند. این مسأله می‌تواند مسیر جدیدی در تحقیق این رابطه در

بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید باشد.

سرولوپلاسمین

از آن جا کـه سرولوپلاسـمین یـک پـروتئین التهـابی و واکنش دهنده‌ی فاز حاد اسـت، انتظـار مـی‌رود کـه در بیماری‌های التهابی از جمله آرتریت روماتوئید بالا رود و از طرف دیگر، سرولوپلاسـمین یـک آنتـی اکسـیدان مهم سرمی است که انواع رادیکـال‌هـای آزاد مشـتق از اکسیژن را خنثی می‌کنـد. مکانیسـم آنتـی اکسـیدان‌هـا پیچیـده و چنـد عـاملی اسـت، امـا سرولوپلاسـمین مهم‌ترین عامل آنتی اکسیدان در سطح خارجی سـلولی است. عملکرد محـافظتی سرولوپلاسـمین بـدین گونـه است که بدون لیبره کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن بـه عنوان آنزیم فروکسیداز سبب کاتالیز آهـن دو ظرفیتـی به آهن سه ظرفیتی می‌شود. بنابراین بـه نظـر مـی‌رسـد فعالیت فروکسـیداز سرولوپلاسـمین ارتبـاط مثبتـی بـا فعالیت اکسیدازی دارد (۱۶).

سطح سرمی سرولوپلاسمین بـا شـدت بیمـاری و فعالیت بیمـاری رابطـه‌ای نـدارد؛ هـر چنـد بـا ESR همبسـتگی مسـتقیمی یافـت شـده اسـت کـه نشـان دهنده‌ی نقش سرولوپلاسمین در ایجـاد التهـاب و یـا یک نشانگر سرمی التهاب می‌باشد (۱۷-۱۶). افـزایش مس باند نشده با سرولوپلاسمین سبب افـزایش مـس آزاد در بیماران آرتریـت روماتوئیـد مـی‌شـود، یعنـی افزایش غلظت سرمی مس به علت شکستن مس بانـد شده بـه سرولوپلاسـمین مـی‌باشـد. افـزایش مـس و سرولوپلاسمین به عنوان یک پاسخ ضد التهـابی ذاتـی در بیماری آرتریت روماتوئیـد و دیگـر بیمـاری‌هـای مفاصل نظر گرفته می‌شود.

سلنیوم

سلنیوم جـزء اساسـی و ضـروری آنـزیم گلوتـاتیون پراکسیداز است که در کنار سوپراکسید دسـموتاز دو بـازوی قـوی پیشـگیری از آسـیب‌هـای اکسـیداتیو سلولی‌اند و دیده شده است کـه فعالیـت گلوتـاتیون پراکسیداز هم مثل سوپراکسید دسموتاز با فعال شدن بیماری آرتریت روماتوئید کاهش می‌یابد. سلنیوم اثر ضد تزایدی و ضد التهابی دارد و اثرات آنتی ویـرال و تغییـر سیسـتم ایمنـی نیـز در آن اثبـات شـده است (۸).

در اکثر مطالعات انجام شده، سطح سرمی سـلنیوم در گروه مورد به طور مشخص پایین‌تر از گروه شاهد بوده است (۱۸، ۸)، اما تنها در بعضـی از پـژوهش‌هـا مشاهده شده است که با افزایش شدت بیماری، سطح سلنیوم کاهش بیشتری می‌یابد (۸). در یـک مطالعـه‌ی هم‌گروهی در فنلاند بر روی ۱۸۷۰۹ نفر افـراد سـالم به مدت ۱۷ سال، ۱۲۲ نفر دچـار آرتریـت روماتوئیـد شدند که سطح سرمی سلنیوم پایـه در آن‌هـا اخـتلاف معنی‌داری را با سـایرین نشـان مـی‌داد (۱۹). Tarp و همکاران در مطالعه‌ای به مقایسه‌ی سـطح سـلنیوم در سرم و گلبول‌های سفید و قرمز و پلاکـت در بیمـاران و گروه شاهد پس از تجویز مکمل سلنیوم پرداختند و افزایش سلنیوم در گروه بیماران در تمام مـوارد فـوق به استثنای لکوسیت‌هـای پلـی مورفونـوکلئر مشـاهده شد (۲۰). در مطالعه‌ی دیگری، سطح سـرمی سـلنیوم در بیماران مبتلا به آرتریـت روماتوئیـد پـایین بـود و ارتباط معنی‌داری بـین سـطح سـلنیوم سـرم و تعـداد مفاصل درگیر وجود داشـت، امـا بـین سـطح سـرمی سلنیوم و مدت بیماری و سـفتی صـبحگاهی و CRP (C-reactive protein) و ESR و تیتر عامل روماتوئید ارتباط معنی‌داری وجود نداشـت (۲۱). نتـایج برخـی ازمطالعات انجام شده در جدول ۱ ملاحظه می‌شود.

جدول ۱. خلاصه‌ای از مقالات استخراج شده توسط موتورهای جستجو

نام مطالعه	سال	تعداد	متغیرهای مورد بررسی	نتایج
Scudder و همکاران (۲۲)	۱۹۷۸		سطح سرمی مس و سرولوپلاسمین	بین سطح سرمی مس و سرولوپلاسمین با فعالیت بیماری ارتباط معنی‌داری وجود داشت.
Banford و همکاران (۲۶)	۱۹۸۲	۸۵ مورد ۴۹ شاهد	سطح سرمی مس، روی و سرولوپلاسمین	- ارتباط معنی‌دار بین سطح سرمی مس و فعالیت بیماری - افزایش سرولوپلاسمین در گروه مورد - عدم ارتباط بین سطح سرمی مس با روی
Youssef و همکاران (۱۳)	۱۹۸۳	۶۰ مورد ۱۴ شاهد	سطح سرمی مس	بین سطح سرمی مس با فعالیت بیماری ارتباط معنی‌داری وجود داشت، اما با سن و جنس و مدت بیماری مرتبط نبود (۱۳).
Zoli و همکاران (۲۴)	۱۹۹۸	۵۷ مورد	سطح سرمی مس و روی	ارتباط مستقیم ESR و CRP با سطح سرمی مس و ارتباط معکوس ESR و CRP با سطح سرمی روی وجود داشت.
Mussalo-Rauhama و همکاران (۳)	۱۹۹۸	۶۰ مورد	سطح سرمی مس و روی	کاهش سطح سرمی روی در بیماران معنی‌دار بود؛ اما با سن ارتباطی نداشت. ارتباط معنی‌دار بین سطح سرمی مس در بیماران و افزایش آن با سن وجود داشت.
Yazar و همکاران (۲۳)	۲۰۰۵	۲۵ مورد ۲۵ شاهد	سطح سرمی مس و روی و سلنیوم	_ کاهش معنی‌دار غلظت سلنیوم _ عدم اختلاف معنی‌دار در غلظت روی
علا و همکاران (۱۱)	۲۰۰۷	۴۰ مورد ۴۰ شاهد	سطح سرمی مس و روی	- کاهش معنی‌دار سطح سرمی روی در بیماران - عدم اختلاف معنی‌دار در غلظت مس - کاهش معنی‌دار نسبت روی به مس در گروه مورد نسبت به گروه شاهد
Taneja و Mandal (۴)	۲۰۰۹	۴۹ مورد ۴۹ شاهد	سطح سرمی مس و روی	کاهش معنی‌دار در سطح سرمی روی و افزایش سطح سرمی مس نسبت به گروه شاهد وجود داشت.
Balogh و همکاران (۱۲)	۱۹۸۰		سطح سرمی روی	سطح سرمی روی در بیماران پایین بود و بین سطح سرمی روی با ESR ارتباط معکوس وجود داشت.
Mazzetti و همکاران (۱۵)	۱۹۹۶		نسبت مس به روی	افزایش نسبت مس به روی در بیماران نسبت به گروه شاهد وجود داشت و نسبت سطح سرمی مس به روی با سطح سرمی RF ارتباط مستقیم داشت.
Confort و همکاران (۱۶)	۱۹۸۳	۸۸ مورد	سطح مس و سرولوپلاسمین سرم	سطح سرمی مس و سرولوپلاسمین در بیماران به طور مشخصی بالا بود.
Louro و همکاران (۲۵)	۲۰۰۰	۴۰ مورد	سطح مس و سرولوپلاسمین سرم	سطح سرمی مس و سرولوپلاسمین در بیماران به طور مشخصی بالا بود.
Tarp و همکاران (۲۰)	۱۹۸۵		سطح سرمی سلنیوم	سطح سرمی سلنیوم در بیماران پایین بود و ارتباط معنی‌داری بین سطح سلنیوم سرم و تعداد مفاصل درگیر وجود داشت، اما بین سطح سرمی سلنیوم و مدت بیماری و سفتی صبحگاهی و CRP ESR و تیتر عامل روماتوئید ارتباط معنی‌داری وجود نداشت.
O'Dell و همکاران (۸)	۱۹۹۱	۱۰۱ مورد RF مثبت و ۲۱ مورد RF منفی	سطح سرمی سلنیوم	سطح سرمی سلنیوم در بیماران پایین بود و ارتباط معنی‌داری بین سطح سلنیوم سرم و فعالیت بیماری وجود داشت وسطح سرمی سلنیوم در بیماران RF مثبت نسبت به بیماران RF منفی پایین‌تر بود.
Tarp (۲۰)	۱۹۹۴		سطح سرمی سلنیوم	سطح سرمی سلنیوم در بیماران پایین بود، اما ارتباطی بین تجویز سلنیوم و سطح سلنیوم لکوسیتی نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد.
Heinle و همکاران (۲۷)	۱۹۹۷	۷۰ مورد	غلظت سلنیوم در اریتروسیت بیماران	غلظت سلنیوم در اریتروسیت بیماران کاهش یافته بود.
Mierzecki و همکاران (۱۰)	۲۰۱۱	۷۴ مورد ۳۰ شاهد	سطح سرمی و اریتروسیتی روی	رابطه‌ی معکوس بین سطح سرمی روی و مدت زمان بیماری وجود داشت.

ESR: Erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; RF: Rheumatoid factor

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، در مطالعات انجام شده تفاوت سطوح سرمی عناصر کمیاب مانند مس، روی، سلنیوم و سرولوپلاسمین بین بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید و افراد سالم بررسی شد. نتیجه‌ی مطالعات نشان داد که متوسط سطوح سرمی سلنیوم و روی در افراد سالم بیشتر از بیماران بود و متوسط سطوح سرمی سرولوپلاسمین و مس در بیماران از گروه شاهد بیشتر بود.

در بررسی رابطه‌ی متغیرهای پیش‌گفته با فعالیت بیماری، هیچ نوع همبستگی بین عناصر کمیاب و شدت بیماری یافت نشد؛ به جز سطح سرمی مس که با فعالیت بیماری، ESR و تعداد مفاصل دردناک ارتباط مستقیم داشت. بنابراین به نظر می‌رسد ذخیره‌ی عناصر کمیاب در بدن با ابتلا به بیماری و فعالیت بیماری در ارتباط باشد. مطالعات مقطعی قدرت پیش‌گویی علت و معلولی بودن این روابط را ندارد و مطالعات هم‌گروهی در این زمینه، می‌تواند این مسأله را روشن کند. هر چند سطوح به دست آمده مربوط به مس در برخی از مطالعات حساسیت بالایی در تشخیص بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید دارد وممکن است در آینده کاربرد بالینی پیدا کند.

References

1. Pazirandeh S, Burns D, Griffin I. Overview of dietary trace minerals. UpToDate [Online]. 2012. [cited 2012 Feb 8]; Available from: URL: http://www.uptodate.com/contents/overview-of-dietary-trace-minerals.
2. Johnson MA, Kays SE. Copper: its role in human nutrition. Nutrition Today. 1990; 25(1): 6.
3. Mussalo-Rauhamaa H, Konttinen YT, Lehto J, Honkanen V. Predictive clinical and laboratory parameters for serum zinc and copper in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1988; 47(10): 816-9.
4. National Research Council. Recommended dietary allowances. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press; 1989.
5. Combs GF, Jr., Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. Pharmacol Ther 1998; 79(3): 179-92.
6. Waterworth C. Arthritis and Selenium [Online]. [cited 2012]; Available from: URL: http://www.livestrong.com/article/433568-arthritis-selenium
7. Brown DH, Buchanan WW, el-Ghobarey AF, Smith WE, Teape J. Serum copper and its relationship to clinical symptoms in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1979; 38(2): 174-6.
8. O'Dell JR, Lemley-Gillespie S, Palmer WR, Weaver AL, Moore GF, Klassen LW. Serum selenium concentrations in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1991; 50(6): 376-8.
9. Cerhan JR, Saag KG, Merlino LA, Mikuls TR, Criswell LA. Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. Am J Epidemiol 2003; 157(4): 345-54.
10. Mierzecki A, Strecker D, Radomska K. A pilot study on zinc levels in patients with rheumatoid arthritis. Biol Trace Elem Res 2011; 143(2): 854-62.
11. Ala S, Shokrzadeh M, Pur Shoja AM, Saeedi Saravi SS. Zinc and copper plasma concentrations in rheumatoid arthritis patients from a selected population in Iran. Pak J Biol Sci 2009; 12(14): 1041-4.
12. Balogh Z, el-Ghobarey AF, Fell GS, Brown DH, Dunlop J, Dick WC. Plasma zinc and its relationship to clinical symptoms and drug treatment in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1980; 39(4): 329-32.
13. Youssef AA, Wood B, Baron DN. Serum copper: a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. J Clin Pathol 1983; 36(1): 14-7.
14. Taneja SK, Mandal R. Assessment of mineral status (Zn, Cu, Mg and Mn) in rheumatoid arthritis patients in Chandigarh, India. Rheumatology Reports. 2009;1(1): 16-20.
15. Mazzetti I, Grigolo B, Borzi RM, Meliconi R, Facchini A. Serum copper/zinc superoxide dismutase levels in patients with rheumatoid arthritis. Int J Clin Lab Res 1996; 26(4): 245-9.
16. Conforti A, Franco L, Menegale G, Milanino R, Piemonte G, Velo GP. Serum copper and ceruloplasmin levels in rheumatoid arthritis and degenerative joint disease and their

pharmacological implications. Pharmacol Res Commun 1983; 15(9): 859-67.
17. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. Arthritis Rheum 2011; 63(3): 573-86.
18. Levander O, Burk R. Selenium. In: Ziegler EE, Filer LJ, editors. Present knowledge in nutrition. Washington, DC: International Life Sciences Institute Press; 1996. p. 320-97.
19. Knekt P, Heliovaara M, Aho K, Alfthan G, Marniemi J, Aromaa A. Serum selenium, serum alpha-tocopherol, and the risk of rheumatoid arthritis. Epidemiology 2000; 11(4): 402-5.
20. Tarp U, Overvad K, Hansen JC, Thorling EB. Low selenium level in severe rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 1985; 14(2): 97-101.
21. Tarp U. Selenium and the selenium-dependent glutathione peroxidase in rheumatoid arthritis. Dan Med Bull 1994; 41(3): 264-74.
22. Scudder PR, Al-Timimi D, McMurray W, White AG, Zoob BC, Dormandy TL. Serum copper and related variables in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1978; 37(1): 67-70.
23. Yazar M, Sarban S, Kocyigit A, Isikan UE. Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Biol Trace Elem Res 2005; 106(2): 123-32.
24. Zoli A, Altomonte L, Caricchio R, Galossi A, Mirone L, Ruffini MP, et al. Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha. Clin Rheumatol 1998; 17(5): 378-82.
25. Louro MO, Cocho JA, Mera A, Tutor JC. Immunochemical and enzymatic study of ceruloplasmin in rheumatoid arthritis. J Trace Elem Med Biol 2000; 14(3): 174-8.
26. Banford JC, Brown DH, Hazelton RA, McNeil CJ, Sturrock RD, Smith WE. Serum copper and erythrocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1982; 41(5): 458-62.
27. Heinle K, Adam A, Gradl M, Wiseman M, Adam O. Selenium concentration in erythrocytes of patients with rheumatoid arthritis. Clinical and laboratory chemistry infection markers during administration of selenium. Med Klin (Munich) 1997; 92(Suppl 3): 29-31. [In German].

Journal of Isfahan Medical School Received: 29.12.2013

Vol. 32, No. 279, 4th Week, May 2014 Accepted: 05.04.2014

Role of the Trace Elements in Rheumatoid Arthritis

Sepideh Hejazi MD[1], Kamila Hashemzadeh MD[2], Maryam Sahebari MD[1]

Review Article

Abstract

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease with unknown origin. Several etiologic factors have been attributed to the pathogenesis of RA, which is substantially derived by inflammatory factor. Trace elements (TE) including selenium, zinc and copper are components of several fundamental enzymes in the oxidative pathways which play crucial role in the prevention of cellular oxidative stress induced by superoxides and free radicals.

Methods: The current study aimed to assess the relationship between serum values of the trace elements and RA disease activity. On this purpose, searching of available electronic databanks by relative keywords and without any time limitation performed.

Findings: The serum levels of selenium, zinc, and zinc/copper ratio in patients with RA were lower than those values in age- and sex-matched healthy control individuals; but zinc had a positive correlation with serum levels of albumin and negative relation with disease duration. Furthermore, copper was positively correlated to disease activity and there was no association between serum level of copper and age or gender. There was a relationship between lower values of selenium and number of affected joints in RA.

Conclusion: It can be concluded that there is a relationship between serum values of trace elements and RA development and disease activity.

Keywords: Rheumatoid arthritis, DAS28, Selenium, Zinc, Copper, Zinc to copper ratio, Albumin, Ceruloplasmin, Trace elements

Citation: Hejazi S, Hashemzadeh K, Sahebari M. **Role of the Trace Elements in Rheumatoid Arthritis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(279): 408-15

1- Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2- Rheumatologist, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Maryam Sahebari MD, Email: sahebarim@mums.ac.ir

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. 279, 4th week, May 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.