

مقاله های پژوهشی

- ۷۰۲ بررسی وضعیت متیلاسیون ژن های SFRP1 و SFRP2 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد در زمان تشخیص
 علی قاسمی، دکتر شهربانو رستمی، نسرین علیزاد قندفروش، عباس قوطاسلو، صادق عباسیان، دکتر فاطمه نادعلی
- ۷۱۲ مقایسه ی شاخص های اصلی سلامت در مناطق روستایی استان اصفهان قبل و بعد از اجرای برنامه ی پزشک خانواده
 دکتر رضا خدیوی، امین کر، الهام فروزنده
- ۷۲۶ استخراج اتوماتیک مرز اجسام لیمن موجود در نمونه های مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیازیس احشایی
 ماریا فرهی، دکتر حسین ربانی، دکتر اردشیر طالبی
- ۷۴۰ مقایسه ی تأثیر داربست های پر پایه ی ابریشم بر تمایز کندروسیت های خرگوشی
 میترا نعیمی، دکتر محمدحسین فتحی، دکتر محمد رفیعی نیا، دکتر شاهین بنکدار

نامه به سردبیر

- ۷۵۲ ویژگی های بالینی و بقای بیماران مبتلا به سرطان رکتوم
 دکتر سیمین همتی، دکتر محمد محمدیان پناه

Original Articles

- Study of SFRP1 and SFRP2 Genes Methylation Status in Patients with De Novo Acute Myeloblastic Leukemia 711
 Ali Ghasemi MSc, Shahrbanoo Rostami PhD, Nasrin Alizad-Ghandforosh MSc, Abbas Ghotaslou MSc, Sadegh Abbasian MSc, Fatemeh Nadali PhD
- Comparing the Main Reproductive Health Indices in Rural Areas of Isfahan province, Iran, before and after Family Physician Program Intervention during 2001-2011 725
 Reza Khadivi MD, Amin Kor, Elham Foruzandeh
- Automatic Boundary Extraction of Leishman Bodies in Bone Marrow Samples from Patients with Visceral Leishmaniasis 739
 Maria Farahi, Hossein Rabbani PhD, Ardeshir Talebi MD
- Comparison of the Effect of Silk Fibroin-Based Scaffolds on Differentiation of Rabbit Chondrocytes 751
 Mitra Naeimi MSc, Mohammadhossein Fathi PhD, Mohammad Rafienia PhD, Shahin Bonakdar PhD
- Letter to Editor
- Clinical Characteristics and Survival of Patients with Rectal Cancer 755
 Simin Hemati, Mohammad Mohammadianpanah MD



مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم، شماره (۲۸۶)، بهمنه سوم 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

امور نشر:
(ویراستاری، صفحه آرایی، طراحی و چاپ)
شرکت فرزانتگان راداندیش
اصفهان، صندوق پستی ۱۷۹۸-۸۱۴۶۵
تلفن و دورنگار: ۰۳۱۱-۶۶۸۶۳۰۲
f.radandish@gmail.com
www.farzaneganco.ir
تیراژ: ۵۰۰ نسخه

ناشر:
انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
نشانی: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
E-mail: publications@mui.ac.ir
دفتر مجله: دانشکده پزشکی
صندوق پستی: ۸۱۷۴۴/۱۷۶
مسئول دفتر: گلناز رجبی
تلفن: ۰۳۱۱-۶۶۹۴۷۳۷ **دورنگار:** ۰۳۱۱-۷۹۲۲۲۹۱
E-mail: jims@med.mui.ac.ir
وب سایت مجله: http://www.journals.mui.ac.ir/jims

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 ایمنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، آمریکا
۱۷- دکتر سید مرتضی حیدری	دانشیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۸- دکتر بهناز خانی	دانشیار، متخصص زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۱۹- دکتر مجید خزاعی	دانشیار، متخصص فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۰- دکتر حسن رزمجو	استاد، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۱- دکتر رضا روزبهانی	استادیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۲- دکتر مسعود سهیلیان	استاد، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲۳- دکتر منصور شعله‌ور	دانشیار، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۴- دکتر محمدرضا صفوی	استادیار، متخصص بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۵- دکتر خسرو عادل‌لی	استاد، متخصص بیوشیمی بالینی، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا
۲۶- دکتر سعید عندلیب	استاد، متخصص پاتولوژی، دانشگاه لوئیس ویل، آمریکا
۲۷- دکتر غلامرضا عسکری	متخصص بیماری‌های پوستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۸- دکتر زیبا فرج‌زادگان	دانشیار، متخصص پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲۹- دکتر حمید فشارکی	دانشیار، متخصص چشم، فلوشیپ ویتره و رتین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۰- دکتر مرجانه فولادی	دکترای پرستاری، دانشگاه فلوریدا، آمریکا
۳۱- دکتر علی قیصری	استاد، فوق تخصص جراحی قلب، کالیفرنیا، آمریکا
۳۲- دکتر منصور کارآموز	استاد، متخصص اورولوژی، کالیفرنیا، آمریکا
۳۳- دکتر رویا کلشادی	استاد، متخصص اطفال، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۴- دکتر جعفر گلشاهی	دانشیار، فوق تخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۵- دکتر عزیز گهروی	استاد، متخصص بیماری‌های پوستی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، کانادا
۳۶- دکتر پروین محزونی	دانشیار، فوق تخصص آسیب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۷- دکتر سید مهدی مدرس	استاد، متخصص چشم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳۸- دکتر محمد مردانی	دانشیار، متخصص علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳۹- دکتر هوشنگ معین	استاد، متخصص جراحی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴۰- دکتر آتیه مغيثی	استاد، متخصص غدد داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، آمریکا
۴۱- دکتر مجید ملکی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴۲- دکتر محمدرضا نوربخش	دانشیار، متخصص فیزیوتراپی، آمریکا
۴۳- دکتر فریدون نوحی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴۴- دکتر علی محمد هنجنی	استاد، متخصص قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

راهنمای 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 A4 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 باید شامل عنوان کامل، عنوان مکرری، اسامی نویسنده یا نویسندگان با بالاترین مدرک تحصیلی، گروه یا بخش یا مؤسسه محل فعالیت ایشان و همچنین آدرس، تلفن، فاکس و پست الکترونیکی نویسنده مسؤول 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 ۳-۵ 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): Inzer N. Treatment of calcific aortic stenosis. Am J Cardiol 1987; 59(6): 314-7.

(FA): Zini F, Basiri Jahromi 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؛ نام نشر؛ 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 نشر؛ 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 مسؤوّل 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 عبارات‌های مخفف در عنوان و خلاصه مقاله خودداری گردد.

۱۷- توضیح کامل در مورد هر کدام از عبارات‌های 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 مسؤوّل ارسال خواهد شد.

- ۱۹- **ملاحظات اخلاقی:** این ملاحظات باید در بخش روش‌ها اشاره گردند. اخذ رضایت‌نامه از کلیه‌ی افراد بالغ شرکت‌کننده در مطالعه ضروری است و در مورد کودکان و افراد تحت تکفل باید از ولی قانونی آنها اخذ شود. ذکر منبع تأییدکننده‌ی 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:** هیچ‌گونه 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 مسؤؤل در کوتاه‌ترین زمان در جریان تصمیم‌سردبیر 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 مسؤؤل 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

- ۷۰۲..... بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP^۱ و SFRP^۲ در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد در زمان تشخیص
علی قاسمی، دکتر شهربانو رستمی، نسرین علیزاد قندفروش، عباس قوطاسلو، صادق عباسیان، دکتر فاطمه نادعلی
- ۷۱۲..... مقایسه‌ی شاخص‌های اصلی سلامت در مناطق روستایی استان اصفهان قبل و بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده
دکتر رضا خدیوی، امین کر، الهام فروزنده
- ۷۲۶..... استخراج اتوماتیک مرز اجسام لیشمن موجود در نمونه‌های مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیازیس احشایی
ماریا فرهی، دکتر حسین ربانی، دکتر اردشیر طالبی
- ۷۴۰..... مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های بر پایه‌ی ابریشم بر تمایز کندروسیت‌های خرگوشی
میترا نعیمی، دکتر محمدحسین فتحی، دکتر محمد رفیعی‌نیا، دکتر شاهین بنکدار

نامه به سردبیر

- ۷۵۲..... ویژگی‌های بالینی و بقای بیماران مبتلا به سرطان رکتوم
دکتر سیمین همتی، دکتر محمد محمدیان پناه

بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران مبتلا به لوسمی میلویدی حاد در زمان تشخیص

علی قاسمی^۱، دکتر شهربانو رستمی^۲، نسرين علیزاد قندفروش^۱، عباس قوطاسلو^۱،
صادق عباسیان^۱، دکتر فاطمه نادعلی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لوسمی میلویدی حاد (Acute myeloid leukemia یا AML) گروه هتروژنی از بدخیمی‌های هماتولوژیک می‌باشند که عوامل زیادی در پاتوژنز آن‌ها دخیل هستند. متیلاسیون DNA در نواحی CpG (Cytosine-phosphate-guanine) پرموتور بعضی از ژن‌ها نقش مهمی در شروع و پیشرفت تومورها دارد. پروتئین‌های SFRP (Secreted frizzled-related protein)، تنظیم کننده‌های منفی مسیر سیگنالینگ Wnt می‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران AML تازه تشخیص داده شده و افراد سالم مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: نمونه‌ی خون محیطی ۴۳ بیمار AML در زمان تشخیص و ۲۵ فرد طبیعی به عنوان شاهد جهت بررسی وضعیت متیلاسیون دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ از تکنیک MSP (Methylation specific- PCR یا Methylation specific- Polymerase chain reaction) استفاده شد. از آزمون Mann-Whitney U برای بررسی ارتباط بین هایپرمتیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ با پارامترهای بالینی بیماران استفاده شد.

یافته‌ها: برای ژن SFRP۱ در افراد بیمار از ۴۳ نمونه ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) و برای ژن SFRP۲ از ۴۳ نمونه ۹ مورد (۲۰/۹) هایپرمتیله بود. در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون این دو ژن مشاهده نشد. بیشترین هایپرمتیلاسیون SFRP۱ ($P = ۰/۰۲۸$) و SFRP۲ ($P = ۰/۰۰۴$) در زیر گروه M۰ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ همانند بسیاری از سرطان‌های توپر، در بیماران مبتلا به AML نیز دیده می‌شود. از این رو احتمال می‌رود که متیلاسیون این ژن‌ها در شروع بیماری نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: لوسمی حاد میلو بلاستیک، SFRP، متیلاسیون DNA

ارجاع: قاسمی علی، رستمی شهربانو، علیزاد قندفروش نسرين، قوطاسلو عباس، عباسیان صادق، نادعلی فاطمه. بررسی وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران مبتلا به لوسمی میلویدی حاد در زمان تشخیص. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ۷۱۱-۷۰۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر فاطمه نادعلی

Email: f-nadali@sina.tums.ac.ir

مقدمه

لوسمی میلویدی حاد (AML) یا Acute myeloid leukemia) یک اختلال کلونال سلول‌های بنیادی است که با تکثیر کنترل نشده سلول‌های بنیادی خون‌ساز، توقف بلوغ سلول‌ها در سطح بلاست و ارتشاح بلاست‌ها در خون محیطی و مغز استخوان همراه می‌باشد (۱). سلول‌های بنیادی خون‌ساز در حالت طبیعی دارای توانایی خودنوسازی (Self-renewal) و تمایز به رده‌های مختلف سلولی می‌باشند. بروز برخی از ناهنجاری‌ها از جمله تغییرات ژنتیکی و جابه‌جایی‌های کروموزومی در پاتوژنز AML مشخص شده است. AML مسؤل ۳۰ درصد از تمام لوسمی‌ها در بزرگسالان است و شایع‌ترین نوع لوسمی حاد در طی چند ماه اول زندگی و در بزرگسالان می‌باشد (۲).

پیشرفت‌ها در تحقیقات مولکولی، درک ما را از لوکموژنز AML بسیار بهبود بخشیده است. علاوه بر عوامل خطر مرسوم مانند سن، شمارش گلبول‌های سفید و سیتوژنتیک، تغییرات ژنتیکی مولکولی مانند موتاسیون‌های ژن‌های NPM1، FLT3 و WT-1 نیز از جمله عوامل پیش‌آگهی دهنده‌ی مهم در بیماران مبتلا به AML می‌باشند. در سال‌های اخیر، نقش ناهنجاری‌های اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون پروموتور ژن‌های سرکوب‌کننده‌ی تومور از جمله خانواده‌ی ژن‌های SFRP (Secreted frizzled related protein) در پاتوژنز سرطان‌ها نشان داده شده است؛ به طوری که این ناهنجاری‌ها می‌توانند در افزایش تکثیر و خودنوسازی، توقف تمایز و آپوپتوز بلاست‌های لوسمیک نقش داشته باشند (۳).

SFRP به عنوان آنتاگونیست مسیر سیگنال‌دهی

Wnt عمل می‌کند و در افراد سالم، مانع از فعال شدن این مسیر سیگنالی می‌گردد. مسیر سیگنال‌دهی Wnt در تنظیم فرایندهایی مانند تقسیم و تمایز سلولی نقش دارد. در بعضی از سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال، سرطان سر و گردن و سرطان معده، این مسیر سیگنالی از حالت عملکرد طبیعی خودش خارج می‌گردد و باعث می‌شود تا سلول‌ها به مقدار زیادی تکثیر یابند و سبب ایجاد سرطان شوند (۴). اولین بدخیمی هماتولوژیک که نقص مسیر پیام‌دهی Wnt در آن گزارش شد، CML (Chronic myeloid leukaemia) بود (۵).

بتا کاتنین یک تنظیم‌کننده‌ی رونویسی درون سلول‌ها می‌باشد که نقش مهمی در سرطان‌ها دارد. کنترل مقدار بتا کاتنین و پایداری آن، یکی از مهم‌ترین وظایف مسیر سیگنال‌دهی Wnt می‌باشد (۶). در شرایط عدم حضور لیگاند Wnt، مقدار بتا کاتنین درون سیتوپلاسم کاهش می‌یابد که علت آن تخریب شدن بتا کاتنین به وسیله‌ی کازئین کیناز ۱ و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳b می‌باشد (۷)؛ اما در شرایطی که لیگاند به گیرنده‌ی خود یعنی Frizzled receptor اتصال می‌یابد، باعث فعال شدن پروتئین‌هایی به نام DV1 (Dishevelled) می‌شود (۸).

با افزایش مقدار سیتوپلاسمی بتا کاتنین و انتقال آن به درون هسته، بیان ژن‌های دخیل در تقسیم و تمایز سلولی افزایش می‌یابد (۹، ۴). متیله شدن ژن SFRP سبب می‌شود تا نقش مهارتی آن از روی مسیر سیگنال‌دهی Wnt برداشته شود که در پی آن، مقدار سیتوپلاسمی بتا کاتنین افزایش می‌یابد و با انتقال به هسته، به عنوان یک عامل رونویسی باعث افزایش بیان ژن‌هایی مانند MYC و سیکلین D می‌شود که در

نمونه‌گیری، سلول‌های تک هسته‌ای شامل بلاست‌های لوسمیک به وسیله‌ی سدیم‌تتاسیون گرادیان غلظت با استفاده از Ficoll-hypaque جدا شدند. سپس DNA با روش استاندارد نمک اشباع استخراج شد (۱۱). در مرحله‌ی بعد، DNA به وسیله کیت (EpiTect Bisulfite Kit, Qiagen) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده تیمار شد. بعد از این تیمار، سیتوزین‌های غیر متیله به یوراسیل تبدیل می‌شوند، در حالی که سیتوزین‌های متیله بدون تغییر باقی می‌مانند. سپس وضعیت متیلاسیون ژن‌های SFRP۲ و SFRP۱ به وسیله‌ی تکنیک MSP (Methylation specific-PCR) (Methylation specific- Polymerase chain reaction) بررسی شد. MSP یک نوع تکنیک PCR است که برای بررسی وضعیت متیلاسیون جزایر CpG (Cytosine-phosphate-guanine) از آن استفاده می‌شود. در این روش از دو جفت پرایمر که مختص بررسی وضعیت متیله و غیر متیله است، استفاده می‌شود. توالی‌های پرایمر برای بررسی وضعیت متیله و غیر متیله در این مطالعه، به همراه اندازه‌ی محصول در جدول ۱ آمده است. توالی این پرایمرها در مطالعات قبلی طراحی شده‌اند (۱۲-۱۳).

تنظیم چرخه‌ی سلول نقش دارند (۱۰).

از آن جایی که متیلاسیون این ژن‌ها ممکن است در شروع بیماری و لوکموژنز AML نقش داشته باشد، در مطالعه‌ی حاضر وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران مبتلا به AML تازه تشخیص داده شده که به مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی تهران مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

از ۲۵ فرد طبیعی به عنوان شاهد منفی و ۴۳ بیمار که ابتلای آن‌ها به AML به تازگی تشخیص داده شده بود و به مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی مراجعه کرده بودند، نمونه‌ی خون محیطی گرفته شد. بیماران بر اساس گروه‌بندی FAB (French-American-British) طبقه‌بندی شدند. اطلاعات بالینی بیماران شامل شمارش گلبول‌های سفید، پلاکت، سن، غلظت هموگلوبین و میزان بهبودی کامل بعد از شیمی درمانی القایی، از پرونده‌های پزشکی بیماران به دست آمد. بعد از

جدول ۱. توالی پرایمرها

توالی	دمای التهاب (bp)	اندازه‌ی محصول (bp)	پرایمر
TGTAGTTTTTCGGAGTTAGTGTGCGCGC	۶۲	۱۲۶	SFRP۱ MF
CCTACGATCGAAAACGACGCGAACG			MR۱SFRP
GTTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT	۵۴	۱۳۵	UF۱SFRP
CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA			UR۱SFRP
GGGTCCGAGTTTTTCGGAGTTGCGC	۶۲	۱۳۸	MF۲SFRP
CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG			MR۲SFRP
TTTTGGGTTGGAGTTTTTGGAGTTGTGT	۶۴	۱۴۵	UR۲SFRP
AACCCACTCTTCACTAAATACAACCTCA			UR۲SFRP

M: Methylated; U: Unmethylated; F: Forward; R: Reverse

ژن‌های SFRP₁ و SFRP₂ با پارامترهای بالینی بیماران، از آزمون‌های Fisher's exact و Mann-Whitney استفاده شد. همه‌ی داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, SPSS Inc., Chicago, IL) آنالیز شد. $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

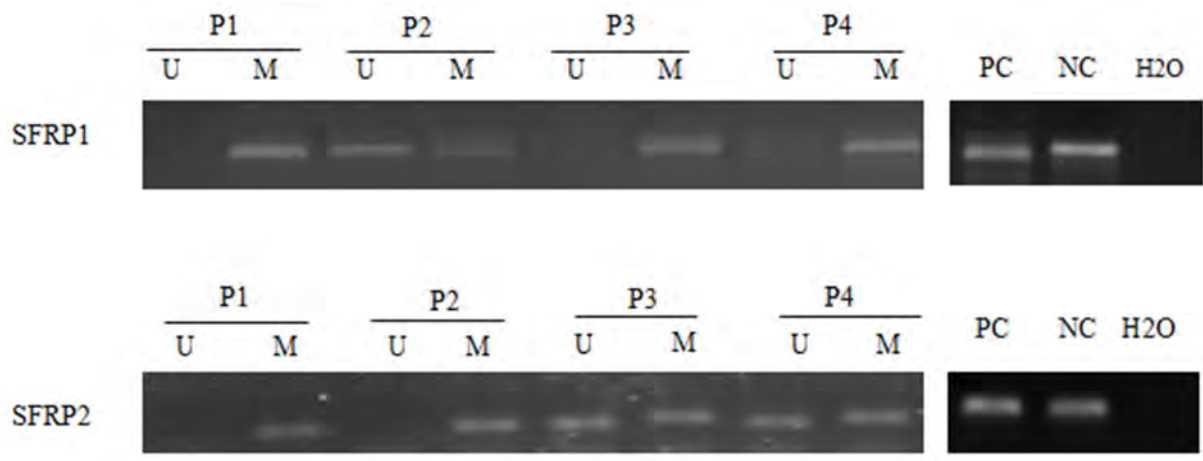
یافته‌ها

از ۴۳ بیمار مورد مطالعه، ۳۱ نفر (۷۲/۱ درصد) مرد و ۱۲ نفر (۲۷/۹ درصد) زن بودند. محدوده‌ی سنی بیماران بین ۷۲-۱۵ سال و میانگین سنی آن‌ها ۴۵/۴ سال بود. شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها به ترتیب در طیف ۱۴۵۰۰۰-۶۰۰، ۲۸۰۰۰۰-۲۰۰۰ و میانگین آن‌ها به ترتیب ۲۷۸۱۸/۵ و ۹۸۶۳۳/۳ سلول در میکرولیتر بود. همچنین طیف غلظت هموگلوبین در این بیماران ۱۴/۸-۶ و میانگین آن ۹/۶ گرم درصد بود. برای ژن SFRP₁ در افراد بیمار از ۴۳ نمونه، ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) به صورت همی متیله، ۱۳ مورد (۳۰/۲ درصد) به طور کامل متیله و ۱۷ مورد (۳۹/۵ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند.

همچنین برای ژن SFRP₂ از ۴۳ نمونه، ۱۶ نمونه (۳۷/۲ درصد) به صورت همی متیله، ۹ نمونه (۲۰/۹ درصد) به طور کامل متیله و ۱۸ مورد (۴۱/۸ درصد) به طور کامل غیر متیله بودند (شکل ۱). در هیچ کدام از نمونه‌های شاهد که مربوط به افراد سالم بودند، متیلاسیون این دو ژن مشاهده نشد. ارتباط بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP₁ و SFRP₂ با علایم بالینی و آزمایشگاهی بیماران در جدول ۲ آمده است.

در واکنش MSP برای هر بیمار ۴ واکنش با پرایمرهای متیله و غیر متیله مربوط به ژن‌های SFRP₁ و SFRP₂ گذاشته شد. برای بررسی وضعیت متیله از ۲ میکرولیتر DNA که از قبل به وسیله‌ی بیسولفیت تیمار شد و ۴/۵ میکرولیتر H₂O، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Forward، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Reverse و برای بررسی وضعیت غیر متیله از ۲ میکرولیتر DNA و ۸/۵ میکرولیتر H₂O، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Forward، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Reverse به همراه ۱ میکرولیتر MgCl₂ استفاده شد. ابتدا اجزای واکنش MSP تحت شرایط پیش دمایی که شامل ۹۸ °C به مدت ۱ دقیقه و ۹۶ °C به مدت ۳ دقیقه بود، قرار گرفت و سپس این واکنش به وسیله‌ی ۴۰ سیکل شامل ۹۹ °C برای ۱۰ ثانیه، ۹۷ °C برای ۲۰ ثانیه، ۵۴ °C برای ۳۰ ثانیه (SFRP₁-UM Primer)، ۶۴ °C برای ۳۰ ثانیه (SFRP₂-UM Primer)، ۶۲ °C برای ۳۰ ثانیه (SFRP_{1,2}-M Primer) و ۷۲ °C برای ۷ دقیقه (Extention) ادامه یافت.

در این آزمایش، از کیت تجاری EpiTect PCR control DNA (Qiagen Inc., cat no. ۵۹۶۹۵) که حاوی DNA غیرمتیله و DNA متیله بود، به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت استفاده شد. جهت تأیید محصول MSP، الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد انجام گرفت. تمام بیماران با رژیم درمانی ۳ + ۷ تحت شیمی درمانی القایی قرار گرفتند. طول مدت درمان برای القای بهبودی کامل در بیماران AML ۳۵-۲۵ روز بود. برای بررسی ارتباط بین متیلاسیون



شکل ۱. وضعیت متیلاسیون پروموتور ژنهای SFRP۱ و SFRP۲ در تعدادی از بیماران مبتلا به AML. شاهد مثبت: PC، شاهد منفی: NC، بیمار: P، متیله: M، غیر متیله: U. از H₂O نیز به عنوان شاهد منفی واکنش MSP استفاده شد.

جدول ۲. ارتباط بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژنهای SFRP۱ و SFRP۲ با علایم بالینی و آزمایشگاهی بیماران

ویژگی‌ها	SFRP۲		مقدار P	SFRP۱	
	U	M		U	M
تعداد بیماران (درصد)	۳۴ (۷۹/۱)	۹ (۲۰/۹)	۰/۳۱۹	۳۰ (۶۹/۷)	۱۳ (۳۰/۲)
سن میانگین (محدوده) (سال)	۵۷ (۱۵-۷۲)	۴۶ (۲۴-۷۰)	۰/۶۵۱	۳۹/۶ (۱۵-۶۰)	۴۵/۴ (۲۳-۶۰)
جنس					
مرد	۲۵	۶		۲۱	۱۰
زن	۹	۳		۹	۳
متوسط تعداد گلبول سفید /l ^۱	۱۴/۴	۶۶/۱	۰/۲۴۲	۳۱/۷	۱۵/۷
متوسط تعداد پلاکت /l ^۱	۱۱۸	۸۹	۰/۶۳۰	۹۵/۶	۱۰۵/۲
متوسط میزان هموگلوبین g/dl	۹/۹	۸/۹	۰/۱۹۰	۹/۹	۸/۹
نوع FAB تعداد (درصد)					
M۰	۰	۲ (۲۲/۲)	۰/۰۲۸	۰	۲ (۱۵/۳)
M۱	۷ (۲۰/۵)	۰	۰/۹۱۹	۵ (۱۶/۶)	۲ (۱۵/۳)
M۲	۹ (۲۶/۴)	۳ (۳۳/۳)	۰/۷۸۹	۸ (۲۶/۶)	۴ (۳۰/۷)
M۴	۸ (۲۳/۵)	۲ (۲۲/۲)	۰/۴۳۳	۸ (۲۶/۶)	۲ (۱۵/۳)
M۵	۸ (۲۳/۵)	۲ (۲۲/۲)	۰/۸۶۳	۴ (۱۳/۳)	۲ (۱۵/۳)
M۶	۲ (۵/۸)	۰	۰/۳۵۲	۲ (۶/۶۶)	۰
طبقه‌بندی نشده	۴ (۱۱/۷)	۰	۰/۸۱۶	۳ (۱۰)	۱ (۷/۶)
نتایج تعداد (درصد)					
بهبودی کامل	۲۵ (۷۳/۵)	۵ (۵۵/۵)	۰/۷۱۷	۱۹ (۶۳/۳)	۹ (۶۹/۲)
بهبودی ناقص	۸ (۲۳/۵)	۲ (۲۲/۲)	۰/۹۶۸	۷ (۲۳/۳)	۳ (۲۳/۰)
مرگ	۱ (۲/۹)	۱ (۱۱/۱)	۰/۵۴۴	۱ (۳/۳)	۱ (۷/۶)
عود	۵ (۱۴/۷)	۱ (۱۱/۱)	۰/۸۶۳	۴ (۱۳/۳)	۲ (۱۵/۳)

M: Methylated; U: Unmethylated; FAB: French-American-British

به ترتیب ۳ و ۲ نفر دارای هایپرمتیلاسیون در پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران با و بدون متیلاسیون و بهبودی کامل پس از درمان القایی مشاهده نشد.

بحث

مسیر سیگنال‌دهی Wnt/ β -catenin در فرایندهایی نظیر تکثیر، مورفولوژی، حرکت، تعیین سرنوشت سلول و رشد ارگان‌ها نقش دارد (۱۴). اختلال در مسیر سیگنال‌دهی Wnt/ β -catenin سبب رشد و تکثیر سلول‌های توموری و همچنین کاهش آپوپتوز آن‌ها می‌شود (۱۵-۱۴). نقش مسیر سیگنال‌دهی Wnt در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سبب به وجود آمدن این فرضیه شده است که نقص در این مسیر سیگنال‌دهی، ممکن است در پاتوژنز لوسمی‌ها نقش داشته باشد (۱۶). SFRP یک پروتئین سرکوب‌کننده تومور می‌باشد که به وسیله‌ی اتصال به پروتئین Wnt مانع از اتصال آن به گیرنده‌اش یعنی Wnt-frizzled receptor می‌شود و در نتیجه باعث غیر فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt می‌گردد. از این رو بین متیلاسیون ژن‌های آنتاگونیست Wnt و فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی Wnt در تومورهای توپر و لوسمی‌ها ارتباط وجود دارد (۱۷، ۱۵). متیلاسیون نابه‌جای ژن‌های سرکوب‌کننده تومور یکی از شایع‌ترین حوادث ژنتیکی در اکثر سرطان‌های انسانی می‌باشد (۱۹-۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر، وضعیت متیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ در ۴۳ بیمار مبتلا به

فراوانی هایپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص به ترتیب ۳۰/۲۳ درصد (۱۳ نفر از ۴۳ بیمار) و ۲۰/۹ درصد (۹ نفر از ۴۳ بیمار) بود. همچنین ۳۲/۲ درصد بیماران در زمان تشخیص (۱۳ نفر از ۴۳ بیمار) برای هر دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ متیله بودند (جدول ۲).

متیلاسیون نابه‌جای این دو ژن در تمام زیر گروه‌های FAB-AML این مطالعه شامل M۰، M۱، M۲، M۴ و M۵ به جز زیر گروه M۶ دیده شد. هایپرمتیلاسیون SFRP۱ (P = ۰/۰۲۸) و SFRP۲ (P = ۰/۰۰۴) در ارتباط با زیر گروه FAB-M۰ مشاهده شد (جدول ۲). هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ با پارامترهای بالینی بیماران شامل جنس، سن، شمارش پلاکت و گلبول‌های سفید مشاهده نشد (جدول ۲). از ۴۳ بیمار ۶ نفر دچار عود شده بودند که از این بین، ۲ نفر (۴/۶ درصد) برای پروموتور ژن SFRP۱ و ۱ نفر (۲/۳ درصد) برای پروموتور ژن SFRP۲ هایپرمتیله بودند. هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور دو ژن SFRP۱ و SFRP۲ با عود بیماران مشاهده نشد.

همچنین اطلاعات مربوط به پاسخ به درمان ۳۸ نفر (۸۸/۳۷ درصد) از بیماران موجود بود. از این تعداد، ۲۸ نفر (۷۵/۶۷ درصد) پس از درمان القایی وارد فاز بهبودی کامل شدند که از این تعداد به ترتیب ۹ و ۵ نفر دارای هایپرمتیلاسیون در پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ بودند. ۱۰ نفر (۲۴/۳۳ درصد) از بیماران مقاوم به درمان القایی بودند و وارد فاز بهبودی نشده بودند که از این تعداد،

Wnt از طریق متیلاسیون پروموتور ژن SFRP۱، سبب مقاومت بیماران مبتلا به CML به درمان با ایماتینیب از طریق مهار اثر ایماتینیب بر روی مسیر سیگنال‌دهی BCR-ABL می‌شود (۲۷).

Wang و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که متیلاسیون ژن‌های SFRP در بیماران مبتلا به MDS (Myelodysplastic syndrome) با پیش‌آگهی بد بیماران و بقای کمتر آن‌ها در ارتباط می‌باشد (۱۷). در این مطالعه هیچ‌گونه ارتباطی بین هایپرمتیلاسیون این ژن‌ها و عوامل پیش‌آگهی دهنده‌ی مرسوم در AML مانند سن و شمارش گلبول‌های سفید مشاهده نشد. همچنین هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون این ژن‌ها و دیگر پارامترهای بالینی مانند جنس بیماران، شمارش پلاکتی و غلظت هموگلوبین مشاهده نشد که ممکن است در صورت افزایش حجم نمونه، ارتباط دیده شود. در مطالعه‌ای که توسط Hou و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که بیشترین هایپرمتیلاسیون مهار کننده‌های مسیر سیگنال‌دهی Wnt در زیر گروه M۰ و کمترین آن در زیر گروه M۴/M۵ صورت می‌پذیرد (۲۸).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که متیلاسیون نابه‌جای این دو ژن در تمام زیر گروه‌های FAB-AML (French-American-British- Acute myeloid leukemia) این مطالعه شامل M۰، M۱، M۲، M۴ و M۵ به جز M۶ اتفاق می‌افتد. همچنین بیشترین هایپرمتیلاسیون SFRP۱ ($P = ۰/۰۲۸$) و SFRP۲ ($P = ۰/۰۰۴$) در زیر گروه M۰ و کمترین هایپرمتیلاسیون SFRP۲ ($P = ۰/۹۱۹$) و SFRP۱ ($P = ۰/۹۳۶$) به ترتیب در زیر گروه‌های M۴ و M۱ صورت می‌پذیرد. بهبودی کامل بعد از درمان القایی

AML در زمان تشخیص بیماری و در ۲۵ نمونه‌ی طبیعی خون محیطی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP۱ و SFRP۲ به ترتیب با فراوانی ۳۰/۲۳ درصد (۱۳ نفر از ۴۳ بیمار) و ۲۰/۹ درصد (۹ نفر از ۴۳ بیمار) در بیماران مبتلا به AML در زمان تشخیص بیماری اتفاق می‌افتد. در حالی که هیچ‌کدام از نمونه‌های طبیعی، متیلاسیون را در ناحیه‌ی پروموتوری این دو ژن نشان ندادند.

Veek و همکاران نشان دادند که در سرطان سینه، SFRP۱ دچار تغییرات اپی‌ژنتیک از جمله متیلاسیون می‌شود که حتی با پیش‌آگهی بد در بیماران نیز در ارتباط می‌باشد (۲۰-۲۱). Cooper و همکاران بعد از تحقیقات خود پیشنهاد کردند که داروی SFRP۱ نوترکیب ممکن است یک استراتژی درمانی جدید برای سرطان‌هایی باشد که بیان SFRP۱ در آن‌ها مهار شده است (۲۲). همچنین متیلاسیون SFRP۲ به عنوان یکی از اهداف اپی‌ژنتیکی در سرطان‌هایی از جمله سرطان کولون (۲۳)، سرطان ازوفاجوس (۱۳)، سرطان مثانه (۹)، سرطان معده (۲۴-۲۵)، سرطان کبد (۲۶) و سرطان ریه (۱۲) نشان داده شده است.

مطالعه‌ی حاضر نیز مانند سایر مطالعات نشان داد که این دو ژن از اهداف اپی‌ژنتیک در بیماران مبتلا به AML هستند که پس از متیلاسیون غیر فعال می‌شوند، از این رو متیلاسیون این دو ژن ممکن است در شروع بیماری نقش داشته باشد. متیلاسیون ژن‌های SFRP در بدخیمی‌های هماتولوژیک نیز نشان داده شده است؛ به طوری که Pehlivan و همکاران نشان دادند که فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی

همچنین در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین متیلاسیون ژن‌های ۱ SFRP و ۲ SFRP با یافته‌های بالینی بیماران مانند سن، جنس، شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها و بهبودی کامل پس از درمان القایی مشاهده نشد. از این رو متیلاسیون این ژن‌ها تنها عامل مرتبط با بیماری نیست؛ بلکه حوادث مولکولی دیگری نیز دخیل می‌باشند. با این وجود، پیشنهاد می‌شود مطالعات وسیع‌تری با تعداد نمونه‌های بیشتر، جهت مشخص شدن نقش هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های SFRP در پاتوژنز AML و همچنین سایر بدخیمی‌های هماتولوژیک صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه‌ی اجرای این مطالعه را تأمین نمود، قدردانی می‌گردد.

در ۶۰-۸۰ درصد بیماران زیر ۶۰ سال مبتلا به AML، مشاهده می‌شود. بهبودی کامل به حضور کمتر از ۵ درصد بلاست در مغز استخوان و اصلاح شمارش سلول‌های خونی (شمارش نوتروفیل بیشتر از ۱۰۰۰ سلول در میکرولیتر، شمارش پلاکت بیشتر از ۱۰۰۰۰۰ سلول در میکرولیتر، هموگلوبین بیشتر از ۱۰ گرم در دسی‌لیتر و عدم حضور بلاست در خون محیطی) تعریف می‌شود. همچنین سلولاریته‌ی مغز استخوان بیشتر از ۲۰ درصد با شواهدی از خون‌سازی هر سه رده‌ی سلولی، باید وجود داشته باشد (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های ۱ SFRP و ۲ SFRP و بهبودی کامل پس از درمان القایی مشاهده نشد و میزان پاسخ به درمان در بیماران با و بدون هایپرمتیلاسیون یکسان بود.

References

- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(14): 1051-62.
- Parkin D, Whelan S, Ferlay J, Teppo L, Thomas D. Cancer incidence in five continents. Vol 3. Lyon, France: IARC Scientific Publications; 2002. p. 155.
- Jost E, Schmid J, Wilop S, Schubert C, Suzuki H, Herman JG, et al. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008; 142(5): 745-53.
- Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5): 387-98.
- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351(7): 657-67.
- Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasia* 2008; 55(3): 165-76.
- Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 2002; 24(9): 811-20.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810.
- Marsit CJ, Karagas MR, Andrew A, Liu M, Danaee H, Schned AR, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7081-5.
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 6): 737-46.
- 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.
- Huang ZH, Li LH, Yang F, Wang JF. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer

- and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2007; 13(6): 950-4.
13. Zou H, Molina JR, Harrington JJ, Osborn NK, Klatt KK, Romero Y, et al. Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer* 2005; 116(4): 584-91.
 14. Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y, Zheng DL, Yang PY, et al. Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2007; 7: 126.
 15. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(1): 55-67.
 16. Mikesch JH, Steffen B, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21(8): 1638-47.
 17. Wang H, Fan R, Wang XQ, Wu DP, Lin GW, Xu Y, et al. Methylation of Wnt antagonist genes: a useful prognostic marker for myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol* 2013; 92(2): 199-209.
 18. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990): 457-63.
 19. Nakamoto D, Yamamoto N, Takagi R, Katakura A, Mizoe JE, Shibahara T. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of malignant mucosal melanoma using whole genome amplification. *Bull Tokyo Dent Coll* 2008; 49(2): 77-87.
 20. Veeck J, Bektas N, Hartmann A, Kristiansen G, Heindrichs U, Knuchel R, et al. Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. *Breast Cancer Res* 2008; 10(5): R82.
 21. Veeck J, Geisler C, Noetzel E, Alkaya S, Hartmann A, Knuchel R, et al. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis* 2008; 29(5): 991-8.
 22. Cooper SJ, von Roemeling CA, Kang KH, Marlow LA, Grebe SK, Menefee ME, et al. Reexpression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(10): 2105-15.
 23. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van EM, Weijnenberg MP, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002; 31(2): 141-9.
 24. Fukui T, Kondo M, Ito G, Maeda O, Sato N, Yoshioka H, et al. Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2005; 24(41): 6323-7.
 25. Qi J, Zhu YQ, Luo J, Tao WH. Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2006; 12(44): 7113-7.
 26. Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, Morandell M, Goebel G, Zitt M, et al. Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* 2004; 363(9417): 1283-5.
 27. Pehlivan M, Sercan Z, Sercan HO. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2009; 33(8): 1062-7.
 28. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Lee MC, Tang JL, Chen CY, et al. Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2011; 105(12): 1927-33.
 29. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50(3): 197-222.

Study of SFRP1 and SFRP2 Genes Methylation Status in Patients with De Novo Acute Myeloblastic Leukemia

Ali Ghasemi MSc¹, Shahrbanoo Rostami PhD², Nasrin Alizad-Ghandforosh MSc¹,
Abbas Ghotaslou MSc¹, Sadeh Abbasian MSc¹, Fatemeh Nadali PhD³

Original Article

Abstract

Background: Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous group of hematologic malignancies with great variability in the pathogenesis and clinical course. DNA methylation of CpG islands within the promoters of specific genes may play roles in tumor initiation and progression. Secreted frizzled-related proteins (SFRPs) are negative regulator of the Wnt signaling pathway. In the present study, we compared the methylation status of SFRP1 and SFRP2 genes promoter in patients with AML and healthy individuals.

Methods: In peripheral blood from 43 patients afflicted with de novo AML and 25 healthy controls, isolated DNA was treated with sodium bisulfite and analyzed by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with primers specific for methylated and unmethylated promoter sequences of the SFRP1 and SFRP2 genes. We used Mann-Whitney u-tests to investigate the correlation between SFRP1 and SFRP2 genes hypermethylation and clinical parameters.

Findings: The frequency of aberrant hypermethylation of SFRP1 and SFRP2 genes promoter in patients with AML was determined 30.2% (13/43) and 20.9% (9/43), respectively. In addition, for all subjects in control group, methylation of SFRP1 and SFRP2 genes promoter were negative. Patients with M0 subtype of FAB-AML had the highest incidence of hypermethylation of SFRP1 (P = 0.028) and SFRP2 (P = 0.004) genes promoter.

Conclusion: The present study showed that, like many solid tumors, SFRPs genes methylation also occurs in AML. Therefore, the methylation of these genes may play a role in leukemogenesis initiation.

Keywords: Acute myeloblastic leukemia, SFRP gene, DNA Methylation

Citation: Ghasemi A, Rostami Sh, Alizad Ghandforosh N, Ghotaslou A, Abbasian S, Nadali F. **Study of SFRP1 and SFRP2 Genes Methylation Status in Patients with De Novo Acute Myeloblastic Leukemia.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(286): 702-11

1- MSc Student, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Hematology-Oncology and Stem cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Fatemeh Nadali PhD, Email: f-nadali@sina.tums.ac.ir

مقایسه‌ی شاخص‌های اصلی سلامت در مناطق روستایی استان اصفهان قبل و بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده

دکتر رضا خدیوی^۱، امین کر^۲، الهام فروزنده^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اصلاح نظام سلامت در ایران، تحت عنوان برنامه‌ی پزشک خانواده، در کل مناطق روستایی و شهرهای با جمعیت کمتر از بیست هزار نفر، از سال ۱۳۸۴ به اجرا گذاشته شد. هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی شاخص‌های اصلی سلامت قبل و بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده بود.

روش‌ها: در این مطالعه که در سال ۱۳۹۱ به صورت Trend analysis انجام شد، شاخص‌های اصلی سلامت، طی یک دوره‌ی ۱۰ ساله، از سال ۱۳۸۱ تا ۱۳۹۰ طی دو دوره‌ی زمانی، یک دوره‌ی زمانی ۴ ساله قبل از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده و یک دوره‌ی ۶ ساله بعد از اجرای این برنامه در استان اصفهان، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌های حیاتی در خانه‌های بهداشت و مراکز بهداشتی-درمانی روستایی، در فرم استاندارد به نام زیج حیاتی گردآوری و طبقه‌بندی می‌شود. این داده‌ها در مراکز بهداشت شهرستان، وارد نرم‌افزار مخصوص زیج حیاتی شهرستان می‌شود. این مطالعه، با بررسی اطلاعات موجود در نرم‌افزار شاخص‌های حیاتی برگرفته از زیج‌های حیاتی مناطق روستایی استان اصفهان، در واحد آمار و رایانه‌ی مرکز بهداشت استان، اجرا شد.

یافته‌ها: میزان مرگ نوزادی (NMR یا Neonatal mortality rate) از ۱۶/۲۳ در هزار نفر تولد زنده (قبل از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده) به ۸/۸ در هزار نفر (بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده) کاهش یافته بود. میزان مرگ شیرخواران (IMR یا Infant mortality rate) از ۲۱/۶۴ در هزار تولد زنده، به ۱۴/۲۰ کاهش یافته بود. همچنین میزان مرگ کودکان زیر ۵ سال (U5MR یا Under-5-year mortality rate)، از ۲۶/۳۳ در هزار نفر تولد زنده تا حد ۱۷/۴۰ پایین آمده بود.

نتیجه‌گیری: به دنبال اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده در مناطق روستایی استان اصفهان، کاهش قابل ملاحظه‌ای در شاخص‌های اصلی سلامتی مانند میزان‌های مرگ نوزادان، مرگ شیرخواران و مرگ کودکان زیر ۵ سال مشاهده می‌شود.

واژگان کلیدی: اصلاح نظام سلامت، پزشک خانواده، میزان مرگ و میر نوزادی، میزان مرگ و میر شیرخواران، میزان مرگ و میر کودکان کمتر از ۵ سال

ارجاع: خدیوی رضا، کر امین، فروزنده الهام. مقایسه‌ی شاخص‌های اصلی سلامت در مناطق روستایی استان اصفهان قبل و بعد از

اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ۷۱۲-۷۱۴

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مرتبط با سلامت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

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

۳- گروه آمار و کامپیوتر، مرکز بهداشت استان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: khadivi@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رضا خدیوی

مقدمه

اصلاح نظام سلامت (Health sector reform یا HSR) به عنوان فرایندی تعریف می‌گردد که هدف آن، اجرای تغییرات اساسی در قسمت‌های مختلف نظام سلامت و کارکردهای آن، به منظور افزایش عدالت در بهره‌مندی مردم از فواید آن‌ها، کارایی مدیریتی و بهبود اثربخشی و در مجموع، برطرف کردن نیازهای سلامت جمعیت تحت پوشش آن‌ها است (۱).

برنامه‌های HSR که در طول دهه‌ی ۱۹۹۰ صورت گرفته‌اند، به طور معمول در یک یا چند گروه مشخص تقسیم‌بندی می‌شوند و یا ترکیبی از چند جنبه‌ی مشترک از هر کدام است. این موارد عبارت از تغییرات مشخص در مکانیسم‌های مالی، در مکانیسم‌های تعیین اولویت، در مکانیسم‌های سازمان‌دهی، از جمله تمرکز زدایی و مکانیسم‌های اعمال قانون می‌باشند. کشورها ممکن است اصلاحاتی را در هر یک از این موارد یا در چند جنبه به صورت همزمان، اعمال نمایند. ممکن است این اصلاحات در سطح ملی باشند و یا در یک یا دو استان، در چارچوب تشکیلات ملی به اجرا گذاشته شوند. اصلاحات می‌تواند تمام نظام سلامت را در بر گیرد، یا به صورت برنامه‌های مداخله‌ای در برخی از قسمت‌های نظام سلامت باشد (۲).

بر اساس چارچوب جدید سازمان جهانی بهداشت (WHO یا World Health Organization)، برای ارزیابی عملکرد نظام‌های سلامت، وضعیت سلامتی (Health status)، پاسخگویی (Responsiveness) و انصاف در مشارکت مالی مردم در هزینه‌های سلامت (Fairness of financing) را به

عنوان سه هدف غایی نظام‌های سلامت، پیش روی مسؤولین قرار داده است که باید در جهت دستیابی به آن‌ها، سیاست‌گذاری نمایند. در راه دستیابی به این سه هدف، سه هدف عملکردی وجود دارد که عبارت از عدالت در دسترسی و بهره‌مندی از خدمات سلامت، اثربخشی و کیفیت می‌باشند.

نظام سلامت، به طرق مختلف می‌بایست برای تحقق آن‌ها، سیاست‌های عملی شفاف و اقدامات منسجم و هدفمند را به اجرا بگذارد. مهم‌ترین هدف عملکردی که دولت‌ها مقید به تحقق آن هستند، گسترش عدالت در برخورداری از خدمات سلامت می‌باشد. عدم عدالت در بهره‌مندی از خدمات سلامت، ممکن است به شکل گسترش بیماری‌ها و یا مشکلات اجتماعی، اقتصادی و یا موارد دیگر، خود را نشان دهد (۳).

بعد از انقلاب اسلامی ایران، سرمایه‌گذاری در امور بهداشت همگانی، باعث ایجاد مراقبت‌های سلامتی اولیه‌ی (PHC یا Previous health care) ساده اما کارآمد در مناطق روستایی شد. امروزه ایران دارای شبکه‌ای عالی از ارائه‌ی خدمات سلامت اولیه می‌باشد که دارای پوشش مناسب در بیشتر مناطق روستایی است. با تحت پوشش قرار دادن گسترده‌ی جمعیت، دسترسی افراد به خدمات بهداشتی بیشتر شده است. در ایران، شبکه‌ای عظیم اعم از بخش دولتی و یا خصوصی، خدمات تخصصی سرپایی و همچنین شبکه‌ای از خدمات پیشگیری ثانویه و ثالثیه در بیمارستان‌ها، به افراد خدمت ارائه می‌دهند. به طور کلی، این تغییرات، به موفقیت ایران در بهبود وضعیت سلامت افراد جامعه کمک شایانی کرده است. متوسط طول عمر ایرانیان به طور فزاینده‌ای

افزایش یافت. امید به زندگی در ایرانیان در زمان تولد به نسبت کشورهای مشابه از نظر شرایط مالی و درآمد، زیادتر شد. به همین صورت، کاهش قابل ملاحظه‌ای در مرگ شیرخواران و اطفال رخ داد. با وجود دستاوردهای چشمگیر نظام سلامت در دو دهه‌ی بعد از انقلاب اسلامی، اما وجود مشکلاتی در نظام ارایه‌ی خدمات سلامت، از جمله نبود پوشش بیمه‌ی سلامت (یا بیمه‌ی درمانی) برای ۱۵-۱۰ درصد از افراد جامعه و به دنبال آن کاهش دسترسی جمعیت قابل توجهی به خصوص قشر فقرا و به ویژه عدم پوشش مناسب ارایه‌ی خدمات سلامت در افراد ساکن در حاشیه‌ی شهرها، از نگرانی مسئولین کشور بود. در همین راستا، پایین بودن عملکرد نظام ارایه‌ی خدمات در مناطق شهری نیز به جدی شدن مشکلات موجود نظام سلامت کشور، منجر شده بود (۴).

برنامه‌های پنج‌ساله‌ی چهارم (سال‌های ۸۹-۱۳۸۴) و پنج‌ساله‌ی پنجم (سال‌های ۹۴-۱۳۹۰) در ایران تأکید جدی بر عدالت اجتماعی و سلامتی و امنیت شخصی دارند. اهداف این برنامه‌ها اداره‌ی درست و مدرنیزه کردن نظام سلامت در استان‌ها، اصلاح قوانین و تقویت نقش حکومت در تولید نظام سلامت، کاهش دادن نابرابری‌ها و بی‌عدالتی در وضعیت سلامت شهروندان و حفاظت مالی آنان در برابر هزینه‌های سلامت و بهبود بیشتر وضعیت سلامت افراد جامعه هستند.

اصلاح نظام سلامت در ایران، تحت عنوان برنامه‌ی پزشک خانواده (Family physician program)، در کل مناطق روستایی و همچنین در مناطق شهری با کمتر از ۲۰ هزار نفر جمعیت، از سال ۱۳۸۴ به اجرا گذاشته شد.

این برنامه بر این نکته تأکید دارد که پزشک خانواده حافظ سلامت (یا به عبارت دیگر، دروازه‌بان سلامت) جمعیتی معین می‌باشد. بر اساس این برنامه، نظام پرداخت از شکل کارانه‌ای به شکل سرانه‌ای تغییر کرد و کلیه‌ی افراد ساکن در مناطق عشایری، روستایی و شهری زیر ۲۰ هزار نفر، تحت پوشش بیمه‌ی سلامتی همگانی قرار گرفتند و بدین شکل، موانع اقتصادی پیش روی شهروندان این مناطق، از طریق کاهش فرانشیزها و کسره‌های بیمه‌ای، تنزل پیدا کرد. افراد بیمه شده‌ی تحت پوشش این برنامه، تنها ۳۰ درصد هزینه‌های خدمات سرپایی (ویزیت پزشک، دارو و خدمات پاراکلینیک) و تنها ۱۰ درصد هزینه‌های خدمات بستری در بیمارستان‌ها را پرداخت می‌کنند. علاوه بر این، دسترسی فیزیکی مردم این مناطق به حجم بالای ارایه دهندگان خدمات سلامت اعم از پزشک عمومی و ماما در تیم پزشک خانواده، بهبود پیدا کرد به نحوی که به ازای هر ۲۵۰۰-۴۰۰۰ نفر از افراد تحت پوشش، یک تیم پزشک خانواده، مستقر گردید (۵-۶).

ارزیابی عملکرد نظام سلامت بسیار حایز اهمیت می‌باشد: اول: به عنوان وسیله‌ای برای تشخیص نقایص نظام سلامت؛ توضیح این که، چرا کشورهایی با سطوح یکسان مالی، به سطوح مناسب و یکسان سلامت، پاسخگویی و عدالت مالی نمی‌رسند. دوم: برای فراهم کردن شاخص‌هایی برای ارزیابی نظام سلامت در طول زمان. هر دوی این فعالیت‌ها به نوبه‌ی خود می‌توانند برای ایجاد مخزنی از شواهد برای قبول یا رد سیاست‌های خاصی از نظام سلامت (از جمله روش‌های تأمین مالی و یا الگوهای ارایه‌ی خدمات سلامت) کمک کننده باشند. به خصوص در

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه Trend analysis بود که در سال ۱۳۹۱ انجام شد. جهت بررسی تعدادی از شاخص‌های سلامت در سال‌های ۹۰-۱۳۸۱ به صورت مقایسه‌ای در دو دوره‌ی زمانی، یک دوره‌ی ۴ ساله (۸۴-۱۳۸۰) قبل از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده و یک دوره‌ی ۶ ساله (۹۰-۱۳۸۵) بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده انتخاب گردید. برنامه‌ی پزشک خانواده در سال ۱۳۸۴ هجری شمسی آغاز گردید. طبق مطالعات دیگر، اطلاعات مربوط به سال ۲۰۰۵ به بعد، مرتبط با طرح پزشک خانواده تلقی می‌شود (۱۰-۹).

جمعیت مورد مطالعه، ۵۶۳۱۳۰ نفر، ساکن در ۷۸ منطقه‌ی روستایی در سراسر استان اصفهان بودند که مشتمل بر ۱۸۸۹۹ کودک زیر ۵ سال و ۱۵۷۷۲۳ زن ۴۹-۱۵ سال بودند که اطلاعات مربوط به شاخص‌های سلامت این افراد در مرکز بهداشت استان اصفهان در دسترس بود.

در مناطق روستایی ایران، داده‌های شخصی، اجتماعی و داده‌های حیاتی هر خانواده و افراد تحت پوشش آن‌ها، طبق فرم‌های یکسان و استاندارد، توسط بهورزان، جمع‌آوری می‌شود و سپس در خانه‌های بهداشت، در یک فرم مخصوص به نام زیج حیاتی، جمع‌بندی و هر ماهه به روز رسانی می‌گردد. داده‌های حیاتی، سپس به مراکز بهداشتی-درمانی روستایی، که اعضای تیم پزشک خانواده در این مراکز حضور دارند، گزارش می‌شوند. در مرکز بهداشتی-درمانی، داده‌ها توسط کارکنان‌های مربوط، ابتدا ارزیابی و سپس طبقه‌بندی می‌شوند و به مرکز بهداشت شهرستان، ارسال می‌گردند. این داده‌ها در مراکز

یک شرایط اقتصادی-اجتماعی خاص، بسیار مناسب هستند. برای ارزیابی عملکرد نظام سلامت، ارزیابی تأثیرات (Outcomes) حاصل از فرایندهای نظام سلامت، ممکن است اطلاعات ارزشمندی را فراهم سازد اما برای تشخیص مشکلات مخفی در لایه‌های زیرین نظام سلامت یا یک برنامه‌ی خاص، کفایت نمی‌کند. در عین حال، برای ارزیابی اثربخشی، عدالت و بهره‌مندی از خدمات سلامت، می‌توان ورودی‌ها، فرایندها و خروجی‌های بلافصل متعاقب مداخلات سلامت را مورد ارزیابی قرار داد (۷).

به نظر می‌رسد که وضعیت بیمه‌های سلامت و سهولت دسترسی به تیم‌های پزشکان خانواده، یک عامل پیشگویی کننده‌ی بارز در برخورداری از خدمات سلامت باشد (۷). بدون شک، پوشش بیمه یکی از عناصر کلیدی در اصلاح نظام سلامت در ایران است، به خصوص با در نظر گرفتن سطح فقر در مناطق روستایی و بالا بودن مقدار پرداخت از جیب مردم برای هزینه‌های سلامت به حدود ۵۷ درصد، اجرای بیمه‌های همگانی می‌تواند با کاهش پرداخت از جیب مردم و کاهش هزینه‌های کمرشکن ناشی از هزینه‌های سلامت، می‌تواند به بهبود شاخص‌های سلامت بینجامد (۸).

این مطالعه، بعضی از شاخص‌های اصلی سلامت مردم ساکن در مناطق روستایی استان اصفهان را در یک دوره‌ی ۱۰ ساله (۹۰-۱۳۸۱) ترسیم می‌نماید و با بررسی روند این شاخص‌ها در دو مقطع قبل و بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده و اجرای پوشش بیمه‌ی همگانی در مناطق روستایی، روند تغییر این شاخص‌ها را (از نظر بروز تغییرات قابل ملاحظه بعد از اجرای بیمه‌ی روستایی)، مقایسه می‌نماید.

(Under-5-year mortality rate)

۳) شاخص پوشش خدمات بهداشت باروری درصد مادرانی که در هفته‌ی اول بعد از زایمان، توسط نیروی بهداشتی ویزیت شده‌اند درصد زایمان‌های مادران روستایی که توسط یک نفر نیروی ورزیده در بیمارستان انجام شده باشد درصد پوشش استفاده از وسایل جلوگیری از بارداری (Percentage of contraceptive coverage). تمامی شاخص‌های استفاده شده در این مطالعه، توسط مرکز بهداشت استان اصفهان جمع‌آوری و بر اساس دستورالعمل‌های وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی محاسبه شده‌اند (۱۰). این تحقیق، بر اساس اطلاعات موجود در نرم‌افزار شاخص‌های حیاتی برگرفته از زیج‌های حیاتی مناطق روستایی استان اصفهان، در واحد آمار و رایانه‌ی مرکز بهداشت استان، تهیه شده است.

در این تحقیق، شاخص‌های موجود در یک دوره‌ی ۴ ساله قبل از اجرای طرح پزشک خانواده و یک دوره‌ی ۶ ساله بعد از اجرای طرح پزشک خانواده، گردآوری و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) تحلیل شدند. همچنین، میانگین شاخص‌ها در هر دوره با کمک آزمون آماری t مستقل با یکدیگر مقایسه شده‌اند که نتایج در جدول ۱ آمده است.

یافته‌ها

به طور متوسط حدود ۷۳۶۰۲۴ در مناطق روستایی استان اصفهان زندگی می‌کنند. به دنبال اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده و به کارگیری پزشک خانواده، یک پزشک به ازای هر ۲۵۰۰-۴۰۰۰ نفر

بهداشت شهرستان وارد نرم‌افزار مخصوص زیج حیاتی شهرستان می‌شود و ضمن بررسی اولیه، شاخص‌های اصلی سلامت از آن‌ها استخراج می‌شود که ضمن ارسال نتایج جمع‌بندی شده به گروه آمار مرکز بهداشت استان، تحت همان برنامه‌ی نرم‌افزاری، ارسال می‌شود.

در این مطالعه، شاخص‌های اصلی سلامت (مربوط به بهداشت باروری) افراد ساکن در مناطق روستایی استان اصفهان (برگرفته از نرم‌افزار زیج حیاتی)، قبل و بعد از اجرای طرح پزشک خانواده مورد مطالعه قرار گرفت. این شاخص‌ها به شرح زیر بودند:

۱) شاخص‌های مربوط به زاد و ولد (Fertility rate):

میزان خام تولد (CDR یا Crude birth rate)،

میزان باروری عمومی (GFR) یا (General fertility rate)

میزان رشد طبیعی جمعیت (NGR) یا (Natural growth rate)

میزان باروری کلی (TFR یا Total fertility rate) درصد نوزادان متولد شده با وزن زیر ۲۵۰۰ گرم حین تولد (LBW یا Low birth weight)

۲) شاخص‌های مربوط به مرگ و میر (Mortality rate):

میزان مرگ و میر خام (CDR) یا (Crude death rate)

میزان مرگ و میر نوزادان (NMR) یا (Neonatal mortality rate)

میزان مرگ و میر شیرخواران (IMR) یا (Infant mortality rate)

میزان مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال (U5MR) یا

سال‌های ۹۰-۱۳۸۱، در دو دوره‌ی زمانی، (۸۴-۱۳۸۰) قبل از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده و یک دوره‌ی ۶ ساله (۹۰-۱۳۸۵)، بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده، در جدول ۱ آمده است. طبق نتایج، کاهش معنی‌داری از نظر آماری در شاخص‌های IMR، NMR و U5MR بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده نسبت به قبل از اجرای این برنامه، دیده می‌شود. شکل ۱، روند کاهشی در میزان مرگ و میر نوزادان، شیرخواران و کودکان زیر ۵ سال در مناطق روستایی استان اصفهان را با شدت بیشتر (همراه با تفاوت آماری معنی‌دار)، بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده نشان می‌دهد.

داده‌های مندرج در شکل ۱، نشان دهنده‌ی یک افزایش یکنواخت در پوشش روش‌های جلوگیری از بارداری در زنان شوهردار ۴۹-۱۵ ساله‌ی مناطق روستایی، به خصوص بعد از اجرای طرح پزشک خانواده به بالای ۷۰ درصد می‌باشد، اما یک کاهش چشمگیری در انتهای سال ۲۰۱۱ اتفاق افتاده است.

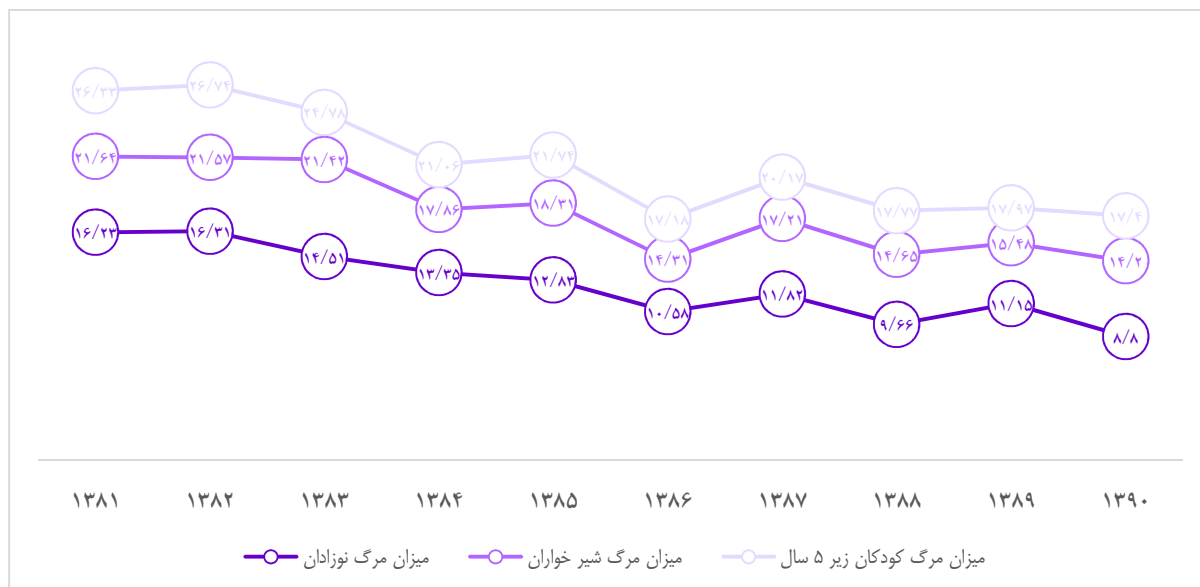
جمعیت، تعداد ۱۹۸ پزشک خانواده، به کار گرفته شدند که دسترسی به پزشک از ۰/۲۱ پزشک به ازای یک هزار نفر جمعیت (قبل از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده) به ۰/۲۷ پزشک به ازای یک هزار نفر جمعیت (بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده) ارتقا یافته است.

از نظر برخورداری از خدمات سلامت در مقوله‌ی زایمان بهداشتی، درصد زایمان‌های مادران روستایی که توسط یک نفر نیروی ورزیده در بیمارستان انجام شده باشد، از ۹۹/۳۲ درصد (قبل از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده)، به ۹۹/۸۰ درصد (بعد از اجرا)، افزایش یافته است. در عین حال، درصد مادرانی که در هفته‌ی اول بعد از زایمان، توسط نیروی بهداشتی ویزیت می‌شدند، از ۹۹/۵۰ درصد در سال ۱۳۸۳ به ۹۹/۸۰ درصد در سال ۱۳۹۰، ارتقا یافته است که تفاوت آماری معنی‌داری دیده نشد.

میزان متوسط شاخص‌های اصلی سلامت باروری در مناطق روستایی استان اصفهان در هر سال، بین

جدول ۱. مقایسه‌ی شاخص‌های اصلی سلامت در مناطق روستایی استان اصفهان قبل و بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده در سال‌های ۹۰-۱۳۸۱

شاخص	سال	بعد از اجرای طرح						قبل از اجرای طرح			
		۱۳۹۰	۱۳۸۹	۱۳۸۸	۱۳۸۷	۱۳۸۶	۱۳۸۵	۱۳۸۴	۱۳۸۳	۱۳۸۲	۱۳۸۱
Crude birth rate		۱۶/۳۴	۱۵/۴۴	۱۵/۸۰	۱۵/۲۲	۱۴/۸۴	۱۵/۰۴	۱۴/۷۶	۱۳/۶۶	۱۳/۶۳	۱۳/۷۳
Natural growth rate		< ۰/۰۰۱	۱/۰۵	۰/۹۸	۱/۰۶	۱/۰۰	۰/۹۶	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۸۴	۰/۸۸
Total fertility rate		۰/۰۱۵	۱/۶۲	۱/۶۲	۱/۶۶	۱/۶۰	۱/۵۵	۱/۶۰	۱/۵۹	۱/۵۲	۱/۵۶
General fertility rate		۰/۰۲۲	۵۷/۷۹	۵۴/۵۵	۵۵/۳۸	۵۳/۰۶	۵۱/۵۳	۵۲/۵۲	۴۹/۳۵	۴۹/۳۵	۵۱/۲۲
Crude death rate		۰/۳۲۸	۵/۶۹	۵/۵۵	۵/۱۱	۵/۲۰	۵/۱۹	۵/۲۳	۴/۹۸	۵/۲۱	۴/۹۴
Neonatal mortality rate		۰/۰۰۳	۸/۸۰	۱۱/۱۵	۹/۶۶	۱۱/۸۲	۱۰/۵۸	۱۲/۸۳	۱۳/۳۵	۱۴/۵۱	۱۶/۳۱
Infant mortality rate		۰/۰۰۱	۱۴/۲۰	۱۵/۴۸	۱۴/۶۵	۱۷/۲۱	۱۴/۳۱	۱۸/۳۱	۱۷/۸۶	۲۱/۴۲	۲۱/۵۷
Under-5-year mortality rate		< ۰/۰۰۱	۱۷/۴۰	۱۷/۹۷	۱۷/۷۷	۲۰/۱۷	۱۷/۱۸	۲۱/۷۴	۲۱/۰۶	۲۴/۷۸	۲۶/۳۳
Low birth weight (%)		۰/۸۷۵	۸/۰۸	۷/۵۹	۷/۰۸	۷/۵۰	۷/۷۷	۷/۱۹	۷/۷۰	۷/۸۳	۶/۹۹
Contraceptive coverage (%)		۰/۱۹۹	۶۶/۶۲	۷۸/۹۹	۷۸/۳۹	۸۰/۳۶	۸۰/۶۰	۷۳/۰۷	۷۱/۶۸	۷۰/۲۸	۷۱/۴۶
Married females (%)		۰/۲۰۱	۶۹/۲۶	۶۷/۴۲	۶۶/۸۰	۶۳/۳۳	۶۲/۷۰	۶۲/۳۹	۶۲/۱۵	۶۲/۰۷	۶۲/۴۸



شکل ۱. روند کاهش شاخص‌های مرگ نوزادان، شیرخواران و کودکان زیر ۵ سال ساکن در مناطق روستایی استان اصفهان

میزان ۲ (از ۱۹ به ۱۷) در هزار تولد زنده رسیده است. اما بعد از سال ۱۳۸۳، این شاخص به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته و به ۱۲/۳۸ در هزار تولد زنده در سال ۱۳۸۵ رسیده است (۱۱). با در نظر گرفتن هدف شماره‌ی ۴ در اهداف توسعه در هزاره‌ی جدید (MDG-۴ یا Millennium development goals)، هدف NMR برای سال ۱۳۸۹، ۱۴ در هزار تولد زنده بوده است (۱۲). در حالی که روند این شاخص در طی سال‌های اخیر، نشان از شدت و سرعت پیش رونده در کاهش میزان مرگ و میر نوزادان، به خصوص بعد از برنامه‌ی پزشک خانواده در همه‌ی مناطق روستایی ایران داشته است.

NMR زودرس (قبل از ۷ روزگی) در کشور کزو، طی مدت زمان مشابه از ۱۲/۶ به ۷/۵ در هزار تولد زنده کاهش یافته است؛ در حالی که NMR در مطالعه‌ی حاضر شامل همه‌ی کودکانی است که در طول ۲۸ روز اول حیات فوت کرده‌اند. به نظر می‌آید که سرعت کاهش NMR در استان اصفهان بیش از

بحث

سبک‌ها و روش‌های اجرای اصلاح نظام سلامت در کشورهای مختلف، متنوع هستند و همه‌ی آن‌ها به خصوصیات و ویژگی‌های مداخلات و اهدافی که در پی اجرای آن‌ها، در نظر گرفته می‌شوند، بستگی دارند. اصلاح نظام سلامت، می‌تواند تمامی سیستم و یا قسمت‌هایی از آن را در بر بگیرد. هر شاخص نشان دهنده‌ی تأثیرات اصلاح نظام سلامت، در شرایطی متفاوت است. بنابراین، برای ارزیابی تأثیرات روی نظام سلامت، استفاده از مجموعه‌ای از این شاخص‌ها که هر کدام به بخش‌های مختلفی از سیستم سلامت اشاره دارند، معقول به نظر می‌رسد (۱۱).

میزان مرگ و میر نوزادان (NMR) در مناطق روستایی استان اصفهان در سال ۱۳۸۱، ۱۶/۲۳ در هزار تولد زنده بوده است که در سال ۱۳۹۰ به ۸/۸۰ در هزار تولد زنده رسیده است. میزان مرگ و میر نوزادان در مناطق روستایی جمهوری اسلامی ایران بین سال‌های ۸۱-۱۳۷۲ تغییر کمی داشته است و فقط به

کشور کزوو بوده است. نکته‌ی قابل توجه این که تعداد تولدهای اصفهان در سال ۱۳۸۹ (حداقل ۶۵ هزار تولد) دو برابر کزوو بوده است و استان اصفهان گستره‌ی بیشتری نسبت به کشور کزوو (با توجه به مناطق محروم) داشته است (۱۳).

میزان مرگ شیرخواران ساکن در مناطق روستایی استان اصفهان (IMR)، از ۱۷/۸۶ در هزار تولد زنده (قبل از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده در سال ۱۳۸۳) به میزان ۱۴/۲۰ در هزار تولد زنده (بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده در سال ۱۳۹۰) رسیده است. متوسط IMR در مناطق روستایی جمهوری اسلامی ایران بین سال‌های ۸۱-۱۳۷۲ از ۳۷/۲ به ۲۵/۲ در هزار تولد زنده، کاهش داشته است. بعد از آن IMR، به طور مداوم کاهش داشته و به میزان یک در هزار در طول هر سال رسیده است. سپس IMR به میزان ۱۸/۳۱ در هزار در سال ۱۳۸۵ رسیده است (۱۴).

وقتی اهداف توسعه‌ی هزاره را بررسی می‌کنیم، هدف در IMR برای سال ۱۳۸۹، ۲۲ در هزار تولد زنده در نظر گرفته شده است. با این وجود، این شاخص‌ها، نشان دهنده‌ی شدت در روند کاهش IMR بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده، در مناطق روستایی ایران می‌باشد.

بر اساس نتایج این مطالعه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، به طور متوسط ۱۷/۴ مورد مرگ کودک زیر ۵ سال به ازای هر هزار تولد زنده را در سال ۱۳۹۰ را برای مناطق روستایی خود، ثبت کرده است. متوسط میزان مرگ کودکان زیر ۵ سال ساکن در مناطق روستایی ایران، از ۴۶/۳ در هزار تولد زنده در سال ۱۳۷۲ به ۲۲/۸ در هزار تولد زنده در سال ۱۳۸۵، به طور متوسط ۱/۵ مورد به ازای هزار تولد زنده،

کاهش پیدا کرده است (۱۴).

کمترین میزان مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال، در بین دانشگاه‌های علوم پزشکی ایران، مربوط به دانشگاه علوم پزشکی تهران با مقدار متوسط ۹/۰۴ در هزار تولد زنده در سال ۱۳۸۷ می‌باشد. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، از نظر رتبه‌بندی شاخص میزان مرگ کودکان زیر ۵ سال، دهمین دانشگاه علوم پزشکی در ایران می‌باشد.

همان‌طور که ذکر شد، این شاخص‌ها از جمله میزان مرگ و میر نوزادان، میزان مرگ و میر شیرخواران و میزان مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال، همگی در مناطق روستایی اندازه‌گیری، ارزیابی و گزارش شده‌اند. این در حالی است که استان اصفهان، یک استان پهناور می‌باشد که در مرکز ایران قرار دارد و دارای روستاهای محروم و دور افتاده‌ی زیادی است. بنابراین، در مقایسه با سایر دانشگاه‌های علوم پزشکی کشور، از جمله دانشگاه علوم پزشکی تهران که مناطق روستایی کمتری دارد، این دستاوردها، حاکی از آهنگ تند در کاهش شاخص‌های مرگ کودکان ساکن در مناطق روستایی این استان می‌باشد که با وجود دور افتادگی مناطق، بهبود دسترسی به خدمات سلامت و ارتقای اثربخشی خدمات سلامت را نوید می‌دهد (۱۰).

متوسط میزان سالانه‌ی کاهش مرگ کودکان زیر ۵ سال در منطقه‌ی مدیرانه‌ی شرقی بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۱/۶ درصد در بین سال‌های ۸۹-۱۳۸۴ بوده است. بر اساس آمار بهداشتی گزارش شده در سال ۱۳۹۱، جمهوری اسلامی ایران، بیست و ششمین کشور از نقطه نظر رتبه‌بندی میزان مرگ و میر کودکان زیر ۵ سال بوده است. با توجه به اهداف

توسعه‌ی هزاره، میزان حداقل U5MR برای سال ۱۳۸۹، ۲۶ در هزار تولد زنده بوده است که استان اصفهان به خصوص مناطق روستایی آن، بسیار بهتر از اهداف هزاره، در راستای کاهش مرگ کودکان زیر ۵ سال، قدم برداشته است (۱۴).

نرخ خام مرگ و میر (CDR) در این دوران از ۴/۹۸ به ۵/۶۹ در هر هزار نفر جمعیت افزایش یافته است. این روند، علاوه بر این که گویای افزایش میزان کلی مرگ‌ها در مناطق روستایی استان اصفهان می‌باشد که لازم است در جای دیگری مورد بررسی قرار گیرد، اما خود گویای این امر است که جمع‌آوری داده‌های حیاتی در سال‌های اخیر، به خصوص در مناطق روستایی استان، توسعه‌ی بیشتری داشته است. به عبارت دیگر، کاهش IMR، NMR و U5MR بعد از اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده، قابل قبول و قابل توجه‌تر هستند.

متأسفانه با وجود تلاش فراوان، مقالات قابل توجهی یافت نشد که نتایج حاصل از اصلاح نظام سلامت یا اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده را در مورد شاخص‌های سلامتی افراد جامعه، به خصوص در کشورهای مشابه از نظر اقتصادی-اجتماعی ارایه کرده باشند تا بتوان آن‌ها را با شاخص‌های کشورمان مقایسه نمود. بسیاری از مطالعات صورت گرفته در کشورهای در حال توسعه، تأکید بر نقش اصلاح نظام سلامت در رفع نابرابری‌ها و اجرای عدالت دارند. این مطالعات، اغلب عدالت در دسترسی به خدمات سلامتی را در نظر دارند که به نظر مهم‌ترین کمک به سلامت جامعه است. هر چند وجود نابرابری و بی‌عدالتی در بسیاری از کشورهای جهان وجود دارد، به وجود آمدن تساوی و عدالت در دسترسی به

سرویس‌های ارایه‌کننده‌ی خدمات سلامت، ممکن است باعث تخفیف بی‌عدالتی در کشورها شود. این مورد به خصوص زمانی اهمیت می‌یابد که ایجاد اصلاحات لازم در عوامل اجتماعی تعیین‌کننده‌ی سلامت، سخت‌تر هستند و یا برای تغییرات لازم، احتیاج به زمان بیشتری دارند. این کشورها مفهوم‌سازی و بسترسازی اصلاح نظام سلامت، یا تعیین اولویت‌ها و یا اجرایی کردن مداخلات سیاسی مقدماتی را شروع کرده‌اند (۱۶-۱۵).

در این جا، به بعضی مطالعات انجام شده در کشورهای در حال توسعه که تأثیرات اصلاح نظام سلامت بر بهداشت باروری را گزارش کرده‌اند، اشاره خواهد شد. برای مثال بین سال‌های ۲۰۰۰-۱۰، NMR در کشور اوگاندا از ۳۲ تا ۲۶ در هزار تولد زنده کاهش یافته است. بعد از توسعه‌ی دسترسی به خدمات اولیه‌ی بهداشتی و افزایش پوشش مراقبت‌های حول زایمان، به خصوص ایمن‌سازی افراد، کاهش ۲/۲ درصدی در NMR و ۴/۱ درصدی در مرگ کودکان ۱ تا ۵۹ ماهه صورت گرفته است. به هر حال، NMR یا U5MR و نمودارهای آن‌ها در کشور ما در حال حاضر بهتر از مواردی بوده‌اند که در اکثر کشورهای آفریقا گزارش شده‌اند (۱۷).

اولین برنامه‌ی اصلاح بخش بهداشت کشور مغولستان با تأکید بر اصلاح و جهت‌دهی مجدد نظام سلامت، از خدمات بیمارستان-محور، به سوی خدمات سلامتی اولیه از طریق فعالیت‌های گروهی خانواده-محور، صورت گرفته است. این مدل که متمرکز بر بهداشت باروری است، با ارایه‌ی خدمات و مراقبت‌های قبل و بعد از زایمان، تنظیم خانواده، درمان بیماری‌های منتقله از طریق تماس جنسی و

مشاوره‌های بهداشت جنسی، به طور رایگان به افراد ثبت نام شده ارائه می‌شده است. پرداخت به صورت سرانه‌ای متکی بر منابع بخش‌های سلامت، مشوق‌هایی برای اجرا به خصوص ثبت بیماران از گروه‌های محروم، به دنبال داشته است (۱۸).

تدابیر مختلف اصلاح نظام سلامت و اقداماتی در این مورد که در مغولستان انجام گرفته است، کاهش MMR از ۲۱۰ در صد هزار تولد زنده در سال ۱۹۹۴ به میزان ۹۸/۸ در صد هزار تولد زنده در سال ۲۰۰۴ را نشان می‌دهد که در راستای اهداف توسعه‌ی هزاره صورت گرفته است. از طرف دیگر، IMR بیش از ۵۰ درصد کاهش را در طی سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۲ (از ۶۴ به ۳۰ در هزار تولد) نشان می‌دهد (۱۸).

نتایج حاصل از اصلاح نظام سلامت در کشور چین، نشان دهنده‌ی کاهش IMR در مناطق روستایی در سال ۱۹۸۱، به میزان ۴۰ در هزار تولد بوده است. این در حالی است که بی‌عدالتی، در مقایسه با مناطق شهری با میزان مرگ و میر شیرخواران ۲۴ در هزار تولد که ۶۰ درصد کمتر از مناطق روستایی است، مشهود می‌باشد. اطلاعات محدودی جهت مقایسه و بررسی تغییرات حاصل در امور بهداشتی در دست می‌باشد. در قسمت‌های مختلف روستایی چین، افزایش هزینه‌های خدمات پزشکی در سال‌های اخیر به علت تورم و نبود بیمه‌ی درمانی در میان جمعیت روستایی چشمگیر بوده است و باعث بار بیشتر بر افراد کم درآمد شده و بر وضعیت سلامت افراد اثرگذار بوده است (۱۹).

پوشش استفاده از وسایل جلوگیری از بارداری در زنان ۱۵-۴۹ ساله در مناطق روستایی استان اصفهان بین سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ به رکورد ۸۰/۶ درصد رسیده

و طی ۳ سال بعد (۹۰-۱۳۸۸) کاهش پیدا کرده است. همچنین درصد زنان متأهل به صورت قابل توجهی در این سال‌ها افزایش یافته است. تمامی خدمات اولیه‌ی بهداشتی مانند ایمن‌سازی کودکان، روش‌های جلوگیری از بارداری حتی روش‌های جراحی در مراکز دولتی رایگان می‌باشد. در واقع، دسترسی آسان به پزشک خانواده جهت مشاوره و استفاده از وسایل جلوگیری از بارداری، باعث شده است نرخ باروری عمومی (GFR) در ده ساله‌ی اخیر به طور متوسط ۵۲/۶ به ازای هر هزار زن ۱۵-۴۹ سال و نرخ باروری کلی (TFR) به طور متوسط ۱/۶ باشد که عددی قابل قبول تلقی می‌شود (۲۰).

این نتایج در موقعیت‌هایی حاصل شده‌اند که بر خلاف بسیاری از کشورهایی که تنها کنترل جمعیت را دنبال می‌کردند و در برنامه‌های اصلاحی آن‌ها، تسهیلاتی برای سقط قرار می‌دادند، در ایران هیچ گونه تدبیری برای سقط جنین به جز در مواردی که فرایند بارداری، برای مادر تهدید جدی می‌باشد (مانند مشکل قلبی پیشرفته یا سندرم سرخجه‌ی جنینی و یا ابتلای جنین به تالاسمی ماژور آن هم در ۶ هفته‌ی اول بارداری)، وجود نداشته است (۱۸).

TFR در سال ۱۳۵۱ (قبل از انقلاب اسلامی ایران)، در زنان مناطق روستایی ایران، ۶/۶ بوده است. به علاوه، TFR در سال ۱۳۶۵ در میان زنان به ۸/۵ رسیده است که بالا بودن این مقدار در ۲۰ سال گذشته، باعث افزایش میزان جمعیت جوان کشور ما شده است (۱۰).

از این رو در حال حاضر با جمعیتی جوان روبه‌رو هستیم که افزایش ازدواج و بنابراین افزایش درصد زنان متأهل در سالیان اخیر، امری اجتناب ناپذیر می‌باشد.

سلامت اولیه و برنامه‌های هدفمند برای دستیابی حداکثری نیازمندان به خدمات مورد نیاز آن‌ها، یک قدم بسیار اساسی برای رفع نابرابری‌های سلامتی است (۲۱).

مراقبت‌های اولیه‌ی سلامتی، به تدریج پیچیده‌تر و نامشخص‌تر از زمان اعلامیه‌ی آلمائای قزاقستان گردیده است، اما ایجاد یک نظام ارایه‌ی خدمات سلامتی اولیه‌ی ادغام یافته که پوشش عمومی افراد جامعه را تضمین نماید، به معنی افزایش بسیار زیاد هزینه‌ها می‌باشد. برنامه‌ی پنجم توسعه‌ی اقتصادی، اجتماعی و فرهنگی کشور، تأکید بر سرمایه‌گذاری بر مراقبت‌های اولیه‌ی سلامتی و گسترش تدریجی برنامه‌ی پزشک خانواده در مناطق شهری به خصوص در مناطق با جمعیت بالای ۲۰ هزار نفر دارد (۶).

در همین راستا، به نظر می‌رسد تحقیقات مشابه که روند شاخص‌های سلامتی مردم ساکن در مناطق شهری، به خصوص در جمعیت‌های فاقد پوشش بیمه‌ای را مورد ارزیابی قرار دهند، می‌تواند سیاست‌گذاری‌های بعدی مسئولین محترم وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و وزارت تعاون، کار و رفاه اجتماعی را در توسعه‌ی برنامه‌ی پزشک خانواده به مناطق شهری، با شفافیت بهتری همراه سازد.

نتیجه‌ی کلی این که شاخص‌های اصلی سلامت کودکان مانند میزان‌های مرگ نوزادان، مرگ شیرخواران و مرگ کودکان زیر ۵ سال، با اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده، به طور قابل ملاحظه‌ای در بخش‌های روستایی استان اصفهان، کاهش یافته‌اند. به علاوه، پوشش استفاده از روش‌های مطمئن جلوگیری از بارداری در زوجین، در حد قابل قبول بوده است و با وجود افزایش نرخ تولد و نرخ رشد جمعیت

نکته‌ی قابل توجه این که استان اصفهان، بیشترین درصد زنان متأهل را در جمهوری اسلامی ایران دارا می‌باشد و تشکیل خانواده‌ی جدید، تمایل به بچه‌دار شدن را افزایش می‌دهد. با وجود آسان بودن دسترسی به پزشکان خانواده برای کارهای مشاوره و رایگان بودن وسایل جلوگیری از بارداری در مراکز بهداشتی-درمانی، درصد پوشش روش‌های جلوگیری از بارداری از میزان ۸۰/۳۶ در سال ۲۰۰۸ تا حد ۶۶/۶۲ در سال ۲۰۱۱ کاهش یافته است. با این وجود، TFR به میزان ۱/۶۲ باقی مانده است که این مورد نشان دهنده‌ی کفایت و کارآمدی برنامه‌ریزی‌های بهداشتی برای خانواده‌ها در مناطق روستایی می‌باشد.

در نهایت، اولویت را بایستی به سرمایه‌گذاری در بهداشت عمومی و مراقبت‌های سلامتی اولیه داد. اصلاح روش حاضر در ارایه‌ی خدمات بهداشت عمومی و ایجاد یک پایه‌ی محکم در بهداشت عمومی و به موازات آن، محکم کردن این شبکه‌ی عظیم، راه درازی است که البته باعث ایجاد خدمات سلامتی عادلانه برای همه می‌گردد. ظرفیت‌سازی به منظور طراحی برنامه‌ها و انجام مداخلات در نظام ارایه‌ی خدمات سلامت عمومی، در وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و وزارت تعاون، کار و رفاه اجتماعی، در نهایت باعث ایجاد رویکردی منسجم برای حفظ سلامتی جمعیت می‌گردد. همکاری قوی‌تر و مشارکت بیشتر در داخل سازمان‌های دولتی و هم در خارج از آن‌ها، نیازاست تا به بهبود زیرساخت‌های سلامت عمومی جامعه بینجامد و افراد آسیب پذیر را در مواجهه با خطرات و آسیب‌ها، مورد حمایت بیشتر قرار دهد. چنین سرمایه‌گذاری در امر سلامت عمومی و همراه با تقویت مراقبت‌های

بهورزان شاغل در خانه‌های بهداشت و کارکنان مراکز بهداشتی - درمانی روستایی سراسر استان اصفهان سپاسگزاری می‌نمایند. همچنین از حمایت‌های مسؤولین محترم گروه گسترش شبکه‌ها و واحد آمار و کامپیوتر مرکز بهداشت استان اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

این مطالعه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مورد حمایت مالی قرار گرفته است. بدین وسیله از این معاونت سپاسگزاری می‌گردد.

(اغلب ناشی از افزایش جمعیت زوجین جوان)، میزان باروری کلی به صورت مداوم ثابت (حدود ۱/۶) بوده است. به عبارت دیگر، شاید بتوان گفت که با اجرای برنامه‌ی پزشک خانواده، نه تنها دسترسی بهتر مردم مناطق روستایی و بهره‌مندی از خدمات سلامت بهبود یافته است، در عین حال کارایی و اثربخشی خدمات سلامت ارایه شده نیز ارتقا یافته است.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران به طور خالصانه از زحمات همه‌ی

References

1. Neema S. The impact of health policies and health sector reform on the readiness of health systems to respond to women's health needs, with special focus on reproductive health, reproductive rights and HIV/AIDS [Online]. [cited 2005 Nov 3]; Available from: URL: <http://www.un.org/womenwatch/daw/egm/enabling-environment2005/docs/EGM-WPD-EE-2005-EP.11%20%20S.pdf>
2. Langer A, Nigenda G, Catino J. Health sector reform and reproductive health in Latin America and the Caribbean: strengthening the links. Bull World Health Organ 2000; 78(5): 667-76.
3. Health Sector Reform Initiative. Methodology for monitoring and evaluation of health sector reform in Latin America and the Caribbean [Online]. [cited 1998 Dec]; Available from: URL: http://www.google.ae/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.paho.org%2Fhq%2Fdocuments%2F87-methodologyformonitoringandevaluationofhealthsectorreforminlatinamericaandthecar-EN.pdf&ei=5XSiu_2EFZWhugSa04LoBg&usq=AFQjCNFsNV5jx96yBFCB4cRk3nen4EIpQA
4. Gressani D, Larbi H, Fetini H, Jorgensen SL, Maeda A, Langenbrunner J. Islamic Republic of Iran - Health Sector Review: Volume 2. Background Sections. Washington, DC: World Bank; 2008.
5. Management and Planning Organization. Low of the fourth Economical and Cultural Development Plan of the Islamic Republic of Iran 2005-2009 [Online]. [cited 2005]; Available from: URL: <http://en.tpo.ir/UserFiles/File/fourth%20plan.pdf> [In Persian].
6. Management and Planning Organization. Low of the fifth Economical and Cultural Development Plan of the Islamic Republic of Iran 2010-2015 [Online]. [cited 2009 Oct]; Available from: URL: <http://www.isacmsrt.ir/files/site1/pages/barnamepanjom.pdf> [In Persian].
7. Peters DH. The role of oversight in the health sector: the example of sexual and reproductive health services in India. Reprod Health Matters 2002; 10(20): 82-94.
8. Kazemian M. Iran's National Health Accounts: Years 1971-2000, Analytical Framework and Methodological Issues. Malaysian Journal of Public Health Medicine 2005; 5(Suppl 1).
9. Raeissi P, Ebadi Fard Azar F, Roudbari M, Shabani Kia H. The impact of family physician program on mother and child health indices in rural population auspices of Mashhad university of medical sciences and health care services, Iran; 2009. Health Management 2011; 14(43): 27-36. [In Persian].
10. Ministry of Health and Medical Education. Health indices of Iran [Online]. [cited 2009]; Available from: URL: <http://www.behdasht.gov.ir/index.aspx?siteid=1&pro=search> [In Persian].
11. Simic S, Milicevic MS, Matejic B, Marinkovic J, Adams O. Do we have primary health care reform? The story of the Republic of Serbia.

- Health Policy 2010; 96(2): 160-9.
12. Azemi M, Gashi S, Berisha M, Kolgeci S, Ismaili-Jaha V. Rate and time trend of perinatal, infant, maternal mortality, natality and natural population growth in Kosovo. *Mater Sociomed* 2012; 24(4): 238-41.
 13. Ministry of Health and Medical Education. The most important indices of vital Horoscope in rural regions of Iran [Online]. [cited 2010]; Available from: URL: www.behdasht.gov.ir [In Persian].
 14. World Health Organization. World health statistics. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.
 15. Harmeling S. Reproductive Health and Health Sector Reform [Online]. [cited 1999 Oct 4-8]; Available from: URL: <http://info.worldbank.org/etools/docs/library/48302/30801.pdf>
 16. Gaumer G, Rafeh N. Strengthening Egypt's Health Sector Reform Program: Pilot Activities in Suez [Online]. [cited 2005 Oct 1]; Available from: URL: <http://www.healthsystems2020.org/content/resource/detail/1639/>
 17. Mbonye AK, Sentongo M, Mukasa GK, Byaruhanga R, Sentumbwe-Mugisa O, Waiswa P, et al. Newborn survival in Uganda: a decade of change and future implications. *Health Policy Plan* 2012; 27(Suppl 3): iii104-iii117.
 18. Hill PS, Dodd R, Dashdorj K. Health sector reform and sexual and reproductive health services in Mongolia. *Reprod Health Matters* 2006; 14(27): 91-100.
 19. Shi L. Health care in China: a rural-urban comparison after the socioeconomic reforms. *Bull World Health Organ* 1993; 71(6): 723-36.
 20. World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) [Online]. [cited 2013]; Available from: URL: <http://www.who.int/gho/countries/irn/en/>
 21. Balarajan Y, Selvaraj S, Subramanian SV. Health care and equity in India. *Lancet* 2011; 377(9764): 505-15.

Comparing the Main Reproductive Health Indices in Rural Areas of Isfahan province, Iran, before and after Family Physician Program Intervention during 2001-2011

Reza Khadivi MD¹, Amin Kor², Elham Foruzandeh³

Original Article

Abstract

Background: Health sector reform (HSR) has done in the Islamic Republic of Iran (I. R. Iran) as family physician program, in rural areas and urban regions of bellow-20-thousands population from 2005. The aim of this study was comparing the main reproductive health indicators before and after implementation of family physician program.

Methods: In a trend study in 2012, we analyzed the reproductive health indices from 2001 to 2011 comparing indices in two intervals, 4 years prior and 6 years after introducing the family physician program in the Isfahan province, Iran. In the rural areas of Iran, personal, social and health data are collected on each person in the community covered by health houses and then are collected by health centers in which family physicians teams are presented. Afterward, data are gathered and assessed in district health centers. These data had been drawn from vital data software. This software existed in every Deputy Director at the District Health Centers. We assessed indicators such as neonatal mortality rate (NMR), infant mortality rate (IMR), under-5-year mortality rate (U5MR), and the percentage of the deliveries carried out by skilled attendance in hospital.

Findings: The NMR decreased from 13.35 per 1000 live births to 8.8. The IMR decreased from 17.86 per 1000 live births to 14.2. The U5MR decreased from 21.06 per 1000 live births to 17.4.

Conclusion: Following family physician program measurements, the main reproductive health indices such as NMR, IMR and U5MR have been decreased markedly in rural areas of the Isfahan province.

Keywords: Health sector reform, Family physician, Reproductive health indicator, Iran, Developing country

Citation: Khadivi R, Kor A, Foruzandeh E. Comparing the Main Reproductive Health Indices in Rural Areas of Isfahan province, Iran, before and after Family Physician Program Intervention during 2001-2011. J Isfahan Med Sch 2014; 32(286): 712-25

* This paper is derived from a medical doctorate thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Associate Professor, Social Determinant of Health Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

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

3- Health Statistics Group, Isfahan Province Health Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Reza Khadivi MD, Email: khadivi@med.mui.ac.ir

استخراج اتوماتیک مرز اجسام لیشمن موجود در نمونه‌های مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیازیس احشایی

ماریا فرهی^۱، دکتر حسین ربانی^۲، دکتر اردشیر طالبی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تشخیص خودکار مرز در تکنیک‌های پردازش تصویر، یکی از مهم‌ترین مراحل تشخیص بیماری توسط کامپیوتر می‌باشد که دقت و صحت مراحل بعدی به طور حساسی به آن وابسته است. پس از رنگ‌آمیزی تصاویر میکروسکوپی میزان آرتیفکت‌های تصویر افزایش می‌یابد. از این رو، یافتن مرز دقیق اشیا به منظور استخراج ویژگی دقیق بسیار مهم می‌باشد.

روش‌ها: در این مقاله، با پردازش تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌های حاصل از اسپیراسیون مغز استخوان افراد مبتلا به بیماری لیشمانیازیس احشایی، به کمک روش‌های آستانه‌گذاری اوتسو (Otsu)، ساوولا (Sauvola) و k-میانگین، جسم لیشمن به صورت خودکار بخش‌بندی شد. به منظور جمع‌آوری مجموعه‌ی تصاویر، دوربین عکس‌برداری دیجیتال Sony DSC-H9 متصل به میکروسکوپ نوری Olympus-CH۴۰RF۲۰۰ استفاده گردید. روش‌های پیشنهادی بر روی ۲۰ تصویر میکروسکوپی آزمایش گردید. جهت شناسایی اجسام لیشمن از بین موارد استخراج شده، برای هر کاندید ویژگی‌های هندسی مانند کشیدگی، نرخ مساحت، گردی، استحکام و ویژگی‌های بافتی مانند میانگین، واریانس، همواری، ممان سوم، یکنواختی و آنتروپی محاسبه شد. سپس با استفاده از طبقه‌بند شبکه‌ی عصبی جلوسو، اجسام موجود به دو گروه سالم و معیوب طبقه‌بندی شدند.

یافته‌ها: در هر روش، به منظور یافتن بهترین حالت اجرایی ممکن، مقایسه‌ی صورت گرفت و مشخص گردید که استفاده از سطح پنج برای روش اوتسو، مقدار آستانه ۰/۱ برای روش ساوولا و تعداد خوشه‌ی پنج برای روش k-میانگین، کمترین میزان خطای استخراج مرز را به دنبال دارند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده پس از مقایسه‌ی دستاوردها با نظر پزشک متخصص، نشان داد که روش ساوولا دارای کمترین خطای استخراج مرز و روش اوتسو بهترین روش برای شناسایی جسم لیشمن می‌باشد.

واژگان کلیدی: تشخیص بیماری توسط کامپیوتر، لیشمانیازیس احشایی، جسم لیشمن، بخش‌بندی، استخراج مرز

ارجاع: فرهی ماریا، ربانی حسین، طالبی اردشیر. استخراج اتوماتیک مرز اجسام لیشمن موجود در نمونه‌های مغز استخوان بیماران

مبتلا به لیشمانیازیس احشایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ۷۳۹-۷۲۶

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۷۲۶۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

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

۲- دانشیار، گروه بیوالکتریک، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: h_rabbani@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین ربانی

مقدمه

لیشمانیازیس احشایی یک بیماری عفونی و بعد از مالاریا کشنده‌ترین بیماری انگلی است. دامنه‌ی تظاهرات بالینی آن از زخم جلدی خود محدود شونده تا تخریب دیررس مخاطی-جلدی و بیماری سیستمیک کشنده متغیر است. سالانه حدود دو میلیون مورد لیشمانیوز پوستی و پانصد هزار مورد لیشمانیوز احشایی در سطح جهان رخ می‌دهد. لیشمانیوز احشایی (کالآزار)، شدیدترین چهره‌ی بالینی لیشمانیوز است. در نوع کالآزار، تشخیص قطعی تنها بر اساس مشاهده‌ی مستقیم انگل لیشمانیا در مواد حاصل از آسپیراسیون مغز استخوان، امکان پذیر می‌باشد (۱).

از آن جا که ابعاد انگل‌های لیشمانیای موجود در نمونه‌های مغز استخوان بسیار کوچک هستند، تشخیص میکروسکوپی آن‌ها در نمونه وقت گیر است. رؤیت انگل در نمونه‌ها نیاز به شخصی خبره دارد و افرادی که با این انگل آشنا نباشند، نمی‌توانند انگل را تشخیص دهند. گاهی انگل در رابطه با دفاع بدن دچار تغییراتی می‌شود که شناختن آن مشکل‌تر می‌شود و این امر نیاز به افراد متخصص و خبره را بیشتر آشکار می‌کند. از این رو، احتمال عدم رؤیت این انگل‌ها توسط چشم و بدون واسط کامپیوتری بسیار زیاد است (۲-۴).

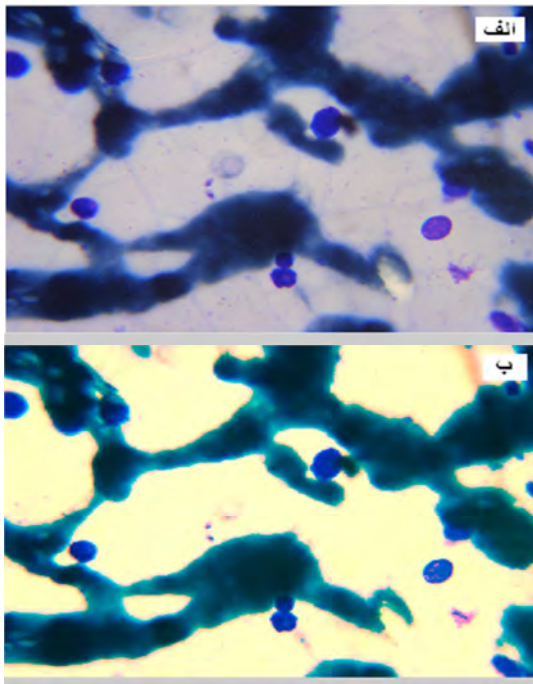
در این مقاله، چند روش سریع و بدون نظارت کاربر برای تشخیص مرز اجسام لیثمن موجود در نمونه‌های مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیازیس احشایی ارائه شده است. روش‌های پیشنهادی بر روی ۲۰ تصویر میکروسکوپی آزمایش شده‌اند. برای تعیین میزان خطای تشخیص مرز، مرز یافته شده با مرزهایی

که پزشک متخصص تعیین کرده است، مقایسه شد. تاکنون روش‌های متنوع زیادی برای استخراج مرز ارائه شده‌اند که بسیاری از این روش‌ها مربوط به تصاویر بالینی بوده‌اند. Pagadala برای استخراج مرز تومور در تصاویر میکروسکوپی، یک روش بر اساس آستانه‌گذاری هیستوگرام توصیف کرد (۵). Schmid برای بخش‌بندی تصاویر میکروسکوپی مقطع درم در پوست، روشی بر اساس خوشه‌بندی رنگ معرفی کرد (۶). او در انجام روش خود از هیستوگرام دو مؤلفه‌ی اصلی در فضای رنگ L^*U^*V استفاده نمود و با رسم نمودارهای هیستوگرام، محل میانگین خوشه‌ها را در مکان قله‌های هیستوگرام نرم شده قرار داد (۷). برای استخراج مرز زخم‌های زیر پوستی، از روش مبتنی بر جریان بردار گرادیان مدل مارها استفاده کرد که در آن مقداردهی کانتور اولیه به صورت خودکار انجام شده بود. Cucchiara و همکاران به منظور استخراج مرز تومور، یک روش نظارتی مبتنی بر محاسبه‌ی مشخصات شعاعی شدت از مؤلفه‌ی شدت فضای رنگ (Hue, saturation and intensity) HSI ارائه دادند (۸).

روش‌ها

جهت جمع‌آوری داده، از مغز استخوان بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی نمونه‌برداری گردید. از آن جایی که انگل‌های لیشمانیا در بین نمونه‌های مغز استخوان به راحتی قابل شناسایی نیستند، برای بررسی راحت‌تر آن‌ها، نمونه‌های گرفته شده در اختیار پاتولوژیست قرار داده شد تا با استفاده از رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی و تشخیص راحت‌تر شود. از این رو لام‌هایی که برای تصویربرداری مورد استفاده قرار گرفتند، رنگی بودند.

تصویر ورودی و s مربوط به شدت تصویر خروجی است و E شیب مربوط به تابع را کنترل می‌کند. نتایج حاصل از این مبحث در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. نتیجه‌ی افزایش کنتراست تصویر به صورت خطی. (الف) تصویر اصلی و (ب) تصویر بهبود یافته

ب- روش مورفولوژی

به دلیل رزولوشن بالای تصاویر، اگر تمام تصویر پردازش شود، مدت زمان اجرای برنامه بسیار زیاد می‌شود. از این رو، برای کاهش زمان اجرای مرحله‌ی پردازش، نیاز است تنها محل‌هایی که مشکوک به حضور جسم لیثمن هستند، دقیق‌تر بررسی شوند و محل‌هایی که مشکوک نیستند، نیازی به بررسی ندارند و می‌توانند حذف شوند. به این منظور، از روش‌های مورفولوژی استفاده و اشیای بزرگ تصویر حذف شدند. سپس با دانستن محل اشیای کوچک، تصویر اصلی به یک یا چند تصویر کوچک‌تر تقسیم

با کمک پزشک متخصص گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus CH40RF200 تنظیم شده بر بزرگ‌نمایی ۱۰۰ که دوربین عکس‌برداری دیجیتال Sony DSC-H9 بر روی آن سوار شد، مرحله‌ی تصویربرداری از لام‌های آزمایشگاهی صورت گرفت. برای اجرای این مقاله با توجه به فرمول حجم نمونه‌ی Cochran، از آن جا که حجم جامعه نامشخص بود، حجم نمونه به صورت رابطه‌ی (۱) تعریف شد:

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2} \quad (1)$$

در ضریب اطمینان ۹۵ درصد، $Z = 1/96$ است و در این مطالعه، چون نمونه‌ها به دو گروه انگل و غیر انگل تقسیم شدند، $p = q = 0/5$ خواهد بود. برای دستیابی به حد مجاز خطا در محاسبات (کمتر از ۰/۱۴)، مقدار حجم نمونه برابر با ۴۹ نمونه تعیین شد.

پیش پردازش تصاویر

الف- افزایش کنتراست

در این مقاله جهت بهبود تصویر از روش افزایش کنتراست نوع یکنواخت مکانی استفاده شد (۹). کنتراست هر سه زیر باند قرمز، سبز و آبی تصاویر با استفاده از تابع کشش کنتراست به صورت خطی افزایش داده شدند. این تابع به صورت رابطه‌ی (۲) تعریف شد:

$$S = T(r) = \frac{1}{1 + \left(\frac{m}{r}\right)^E} \quad (2)$$

که در آن ورودی‌های کمتر از m به محدوده‌ی باریک و تاریک و ورودی‌های بیشتر از m به محدوده‌ی باریک و روشن فشرده شدند و نتیجه‌ی کار یک تصویر با کنتراست بالاتر بود. r مربوط به شدت

که در آن σ_w^2 واریانس درون کلاسی، σ_1^2 واریانس کلاس اول و σ_2^2 واریانس کلاس دوم می‌باشد.

ب- آستانه‌گذاری ساوولا

یک تصویر مقیاس خاکستری که در آن $g(x, y) \in [0-255]$ ، شدت پیکسل در مکان (x, y) را نشان می‌دهد، در نظر بگیرید. در تکنیک‌های آستانه‌گذاری محلی، هدف محاسبه‌ی آستانه‌ی $t(x, y)$ برای هر پیکسل می‌باشد؛ به طوری که:

$$O(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{if } g(x, y) \leq t(x, y) \\ 255 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (5)$$

در روش ساوولا (Sauvola)، آستانه‌ی $f(x, y)$ با استفاده از میانگین $m(x, y)$ و انحراف معیار $s(x, y)$ شدت‌های پیکسل در یک پنجره‌ی $W \times W$ حول (x, y) محاسبه می‌شود (۱۱):

$$f(x, y) = m(x, y) \left[1 + k \left(\frac{s(x, y)}{R} - 1 \right) \right] \quad (6)$$

که R مقدار بیشینه‌ی انحراف معیار است $(R = 128)$ برای یک تصویر خاکستری، و k پارامتری است که مقادیر مثبتی در بازه‌ی $(0/5 - 0/2)$ را می‌دهد. میانگین محلی $m(x, y)$ و انحراف معیار محلی $s(x, y)$ مقدار آستانه را مطابق با کتتراست در همسایگی محلی پیکسل انطباق می‌دهد.

شد و تنها از این تصاویر کوچک (زیر تصویر) جهت پردازش اصلی استفاده گردید.

روش مورفولوژی استفاده شده عبارت از عنصر ساختمانی بیضی شکلی است که تصویر به وسیله‌ی آن باز و بسته و ماسک اولیه تولید شد. این ماسک نشان دهنده‌ی محل‌هایی است که مشکوک به حضور انگل می‌باشد و برای بررسی بیشتر به مرحله‌ی پردازش فرستاده می‌شود. مطالب ارایه شده در این قسمت در شکل ۲ آمده است.

بخش بندی تصویر

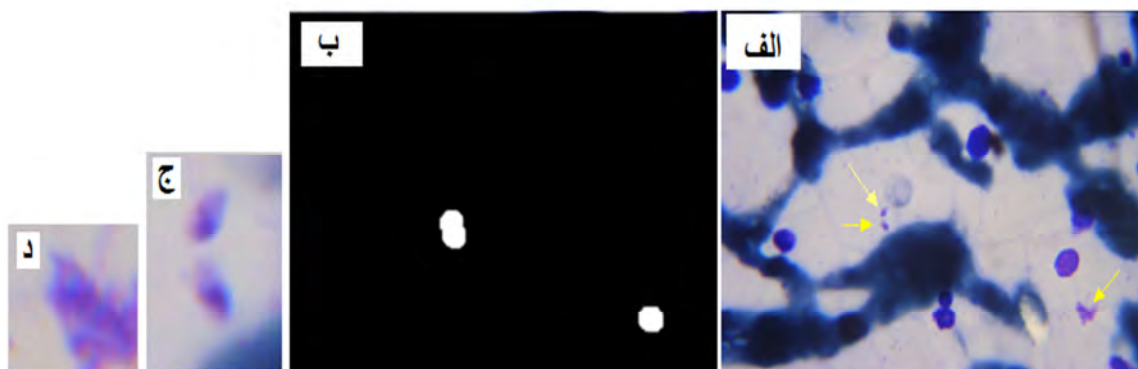
الف- آستانه‌گذاری اوتسو

یک تصویر مقیاس خاکستری که در آن $g(x, y) \in [0-255]$ ، شدت پیکسل در مکان (x, y) را نشان می‌دهد، در نظر بگیرید. در تکنیک‌های آستانه‌گذاری کلی، هدف محاسبه‌ی آستانه‌ی t برای پیکسل‌ها می‌باشد؛ به طوری که:

$$O(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{if } g(x, y) \leq t \\ 255 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3)$$

در روش اوتسو (Otsu)، مقدار t با استفاده از حداقل سازی واریانس درون کلاسی به دست می‌آید (۱۰):

$$\sigma_w^2(t) = q_1(t)\sigma_1^2(t) + q_2(t)\sigma_2^2(t) \quad (4)$$



شکل ۲. روند تولید ماسک اولیه و زیر تصویرهای کاندید. از راست به چپ: تصویر اصلی، ماسک اولیه و زیر تصویرهای مورد بررسی

$$J = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n \|x_i^{(j)} - C_j\|^2 \quad (7)$$

که در آن $\| \cdot \|$ معیار فاصله‌ی بین نقاط و C_j مرکز خوشه‌ی j ام است.

با وجود این که خاتمه پذیرگی الگوریتم بالا تضمین شده است؛ اما جواب نهایی آن واحد نیست و همواره جوابی بهینه نمی‌باشد. به طور کلی، روش K-means دارای مشکلات زیر است.

- جواب نهایی به انتخاب خوشه‌های اولیه وابسته است.
- روالی مشخص برای محاسبه‌ی اولیه‌ی مراکز خوشه‌ها وجود ندارد.
- اگر در تکراری از الگوریتم تعداد داده‌های متعلق به خوشه‌ای صفر شد، راهی برای تغییر و بهبود ادامه‌ی روش وجود ندارد.

۴-۱ استخراج ویژگی

ویژگی‌های استخراج شده در این مقاله، به دو دسته تقسیم می‌شوند: ویژگی‌های هندسی (Geometric features) و ویژگی‌های بافت (Texture features) (۱۳). در مجموع، تعداد ۶۵ ویژگی برای هر کاندید به شرح زیر استخراج شد.

الف- ویژگی‌های هندسی

ویژگی‌های هندسی استخراج شده در این تحقیق به قرار زیر هستند:

- ۱- مساحت (Area) شیء مورد بررسی: از این ویژگی برای حذف اشیای یافت شده‌ی بسیار بزرگ و یا بسیار کوچک استفاده می‌شود.
- ۲- نسبت مساحت هسته‌ی انگل به کل انگل (Nucleus-Parasite ratio): از نظر مورفولوژی، هسته‌ی جسم لیشمن سه تا چهار برابر کوچک‌تر از کل آن می‌باشد.

زمانی که کنتراست بالا در بعضی مناطق تصویر وجود دارد، $s(x, y)$ به طور تقریبی برابر R است که در نتیجه‌ی آن، $t(x, y)$ به طور تقریبی برابر با $m(x, y)$ می‌شود. با این وجود، تفاوت زمانی به وجود می‌آید که در همسایگی محلی، کنتراست بسیار کم باشد. در این صورت، آستانه $t(x, y)$ کمتر از مقدار میانگین می‌شود. در نتیجه مناطق به نسبت تاریک از پس زمینه با موفقیت حذف می‌شوند. پارامتر K مقدار آستانه را در پنجره‌ی محلی تنظیم می‌کند؛ به طوری که هر چقدر مقدار k بیشتر شود، مقدار آستانه از میانگین محلی $m(x, y)$ نیز کمتر می‌شود. در کل، الگوریتم به مقدار k استفاده شده خیلی حساس نیست.

ج- خوشه‌بندی k-میانگین

در خوشه‌بندی سعی می‌شود تا داده‌ها به خوشه‌هایی تقسیم شوند که شباهت بین داده‌های درون هر خوشه حداکثر و شباهت بین داده‌های درون خوشه‌های متفاوت حداقل شود. روش خوشه‌بندی K-means، یک روش پایه برای بسیاری از روش‌های خوشه‌بندی دیگر (مانند خوشه‌بندی فازی) محسوب می‌شود (۱۲). برای این الگوریتم شکل‌های مختلفی بیان شده است؛ اما همه‌ی آن‌ها دارای روالی تکراری هستند که برای تعدادی ثابت از خوشه‌ها سعی در تخمین موارد زیر دارند:

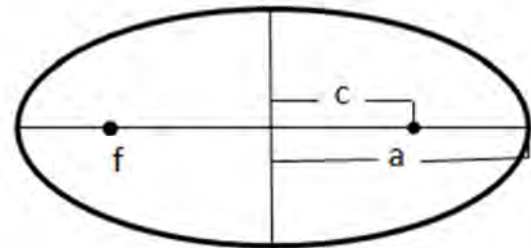
- به دست آوردن نقاطی به عنوان مراکز خوشه‌ها که این نقاط در واقع همان میانگین نقاط متعلق به هر خوشه هستند.
- نسبت دادن هر نمونه‌ی داده به یک خوشه که آن داده کمترین فاصله تا مرکز آن خوشه را دارا باشد.
- در این روش، تابع زیر به عنوان تابع هدف مطرح است.

۳- استحکام (Solidity): از آن جا که اجسام لیشمن دوکی شکل می‌باشند، نسبت به آرتیفکت‌های موجود در تصویر از استحکام بیشتری برخوردار هستند. مقدار مستحکم بودن (یا متخلخل نبودن) شیء مورد بررسی به صورت زیر محاسبه می‌شود.

۴- کشیدگی: با توجه به دوکی شکل بودن اجسام لیشمن، میزان کشیدگی آن‌ها قابل توجه است. ضریب کشیدگی نسبت میان فاصله‌ی کانونی بیضی و شعاع بزرگ آن تعریف می‌شود و به صورت زیر است:

$$\text{Solidity} = \frac{\text{Convex hull area}}{\text{area}} \quad (8)$$

۵- میزان گردی هسته: هسته‌ی اجسام لیشمن در مقایسه با هسته‌ی تعریف شده برای سایر آرتیفکت‌ها گردتر می‌باشد. میزان گردی هسته با توجه به مساحت و قطر محیط آن با استفاده از رابطه‌ی (۱۰) محاسبه می‌شود.



شکل ۳. فاصله‌ی کانونی و شعاع بزرگ بیضی

$$\text{Eccentricity} = \frac{c}{a} \quad (9)$$

۶- ویژگی‌های بافت

یک روش مهم برای توصیف یک ناحیه، یافتن کمیت‌های مربوط به بافت آن ناحیه می‌باشد. یکی از روش‌های پرکاربرد در تحلیل بافت بر مبنای خصوصیات آماری هیستوگرام

$$\text{Roundness} = \frac{4\pi A}{p^2} \quad (10)$$

$$\mu_n = \sum_{i=0}^{L-1} (z_i - m)^n p(z_i) \quad (11)$$

که در آن Z_i متغیر تصادفی مربوط به شدت، $p(z)$ هیستوگرام سطوح شدت در یک ناحیه، L تعداد سطوح شدت ممکن می‌باشد. لازم به ذکر است که ممان دوم یعنی $\mu_2(z)$ همان واریانس σ^2 است.

ویژگی‌های بافتی به کار رفته در این تحقیق به شرح زیر می‌باشند:

۱- میانگین: مقدار میانگین شدت بافت را اندازه‌گیری می‌کند و به صورت زیر محاسبه می‌شود.

$$m = \sum_{i=0}^{L-1} z_i p(z_i) \quad (12)$$

۲- انحراف معیار: مقدار میانگین کنتراست بافت را اندازه‌گیری می‌کند و به صورت زیر به دست می‌آید:

$$\sigma = \sqrt{\mu_2(2)} = \sqrt{\sigma^2} \quad (13)$$

۳- همواری: میزان صافی نسبی مربوط به شدت یک ناحیه را اندازه‌گیری می‌کند و از رابطه‌ی (۱۴) محاسبه می‌شود:

$$R = 1 - \frac{1}{(1+\sigma^2)} \quad (14)$$

R برای یک ناحیه با شدت ثابت، صفر و برای

مناسب از جعبه‌ی ابزار تشخیص الگو با شبکه‌ی عصبی موجود در متلب استفاده شد. شبکه‌ی طراحی شده از نوع شبکه‌های عصبی جلوسو می‌باشد. این شبکه از دو لایه‌ی مخفی از نورون‌های سیگموئید تشکیل می‌شود و هر دو لایه، از تابع انتقال Tansig استفاده می‌کند. تعداد نورون‌های ورودی با توجه به تعداد ویژگی‌ها، ۶۵ نورون، تعداد نورون‌های لایه‌ی مخفی اول ۱۰ نورون و تعداد نورون لایه‌ی خروجی یک نورون می‌باشد.

یافته‌ها

روش پیشنهادی در این تحقیق با توجه به حجم نمونه‌ی تعیین شده با روش حجم نمونه‌ی Cochran، بر روی ۲۰ تصویر که حاوی ۴۹ انگل می‌باشند، پیاده‌سازی شد. تعداد کل اشیای یافت شده در این ۲۰ تصویر، برابر با ۲۶۳ شیء بود که برای تصمیم‌گیری به مرحله‌ی استخراج ویژگی و طبقه‌بندی برده شدند. روش‌های مورد بررسی در نرم‌افزار متلب R2009b با استفاده از لپ‌تاپ مدل Sony با مشخصات پردازنده‌ی Core ۲ due و ۲/۴ گیگا بایت حافظه‌ی RAM، اجرا شدند. زمان اجرای روش پیشنهادی برای هر تصویر با توجه به تعداد کاندیدهای انتخاب شده در تصویر متفاوت بود.

نتایج حاصل از روش پیشنهادی به دو دسته تقسیم می‌شود: نتایج مربوط به بخش‌بندی اجسام لیثمن و نتایج مربوط به شناسایی این اجسام. در ادامه این نتایج توضیح داده شده‌اند.

نتایج حاصل از بخش‌بندی

به منظور بررسی دقت بخش‌بندی، مقایسه‌ای بین مرز مشخص شده توسط روش‌های بخش‌بندی خودکار

یک ناحیه با سطوح شدت متغیر، یک است. در عمل واریانس مورد استفاده در این اندازه‌گیری در بازه‌ی (۰-۱) نرمال می‌شود. این کار با تقسیم واریانس بر $(L-1)^2$ انجام می‌شود.

۴- ممان سوم: میزان تقارن یک هیستوگرام را اندازه‌گیری می‌کند و به صورت زیر به دست می‌آید:

$$\mu_3 = \sum_{i=0}^{L-1} (z_i - m)^3 p(z_i) \quad (15)$$

این مقدار در مورد یک هیستوگرام متقارن، صفر؛ در مورد یک هیستوگرام متمایل به راست، مثبت و در مورد یک هیستوگرام متمایل به چپ، منفی است. برای این که مقادیر حاصل با سایر اندازه‌گیری‌های انجام شده قابل مقایسه باشد، کلیه‌ی مقادیر با تقسیم بر $(L-1)^2$ نرمال می‌شوند.

۵- یکنواختی: میزان یکنواختی بافت را اندازه‌گیری می‌کند. این مقدار با استفاده از رابطه‌ی (۱۶) محاسبه می‌شود:

$$U = \sum_{i=0}^{L-1} p^2(z_i) \quad (16)$$

در صورتی که کلیه‌ی سطوح خاکستری برابر باشند، این مقدار حداکثر خواهد بود.

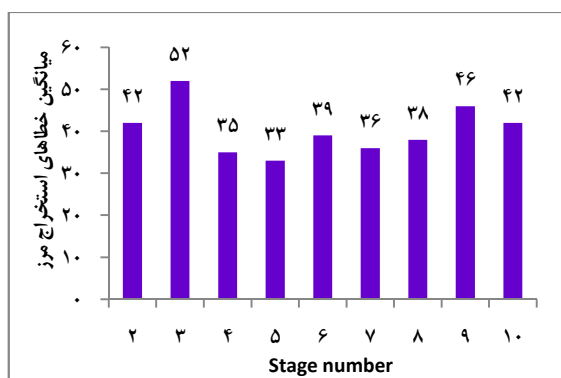
۶- آنتروپی: میزان ماهیت تصادفی بافت را اندازه‌گیری می‌کند.

$$e = \sum_{i=0}^{L-1} p(z_i) \log_2 p(z_i) \quad (17)$$

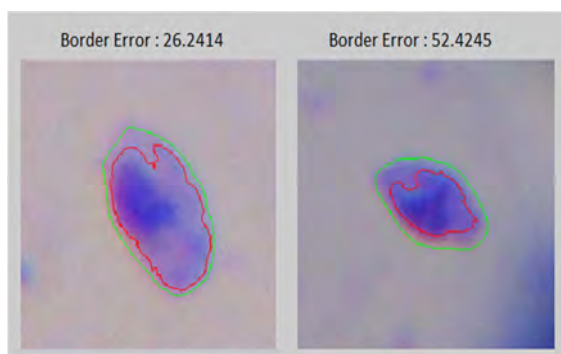
طبقه‌بندی کاندیدها

پس از استخراج ویژگی‌های مناسب از کاندیدها، لازم است سالم یا معیوب بودن هر کاندید مشخص شود. اگر تعداد ویژگی‌های مورد بررسی در هر کاندید زیاد باشد، می‌توان برای طبقه‌بندی کاندیدها، از روش‌های طبقه‌بندی کننده استفاده نمود. در این تحقیق، برای طبقه‌بندی کاندیدها از شبکه‌های عصبی مصنوعی استفاده شده است. در این تحقیق، برای ایجاد شبکه‌ی

شکل ۵ نمونه‌هایی از نتایج این آستانه‌گذاری آمده است.



شکل ۴. میزان میانگین خطاهای استخراج مرز محاسبه شده در هر سطح به روش اوتسو



شکل ۵. مقایسه‌ی مرز استخراج شده توسط روش آستانه‌گذاری اوتسو با مرز تعیین شده توسط پزشک متخصص. میزان خطای محاسبه شده برای هر تصویر بر حسب درصد بیان شده است.

در شکل ۵، در هر تصویر، منحنی سبز رنگ مرزی است که توسط پزشک متخصص به صورت دستی تعیین شده و منحنی قرمز رنگ، مرز استخراج شده با روش آستانه‌گذاری اوتسو است.

ب- آستانه‌گذاری ساوولا

ابتدا برای تعیین بهترین مقدار آستانه و بهترین ماسک اولیه، میزان خطای مرز استخراج شده با توجه به مقادیر آستانه‌ی مختلف (از صفر تا یک با گام ۰/۱) و ماسک‌های اولیه‌ی متفاوت (مربعی با ابعاد ۳ تا ۲۵۶

ذکر شده در قسمت ۲ و مرز تعیین شده توسط پزشک صورت گرفته است. میزان خطای موجود با استفاده از رابطه‌ی (۱۸) به دست آمده است (۱۴):

(۱۸)

$$\text{Border Error} = \frac{\text{Area}(\text{Automatic Border} \oplus \text{Manual Border})}{\text{Area}(\text{Manual Border})} \times 100$$

که در آن Automatic Border تصویر باینری حاصل از شناسایی خودکار توسط روش‌های بخش‌بندی می‌باشد. Manual Border تصویر باینری تعیین شده توسط پزشک متخصص است و \oplus نشان دهنده‌ی عملگر «یا انحصاری» (XOR یا Exclusive OR) است.

الف- آستانه‌گذاری اوتسو

در این تحقیق، عملیات آستانه‌گذاری اوتسو برای سطوح ۲ تا ۱۰ انجام شده است و در هر سطح، میزان خطای استخراج مرز به دست آمده است. لازم به ذکر است که در این روش، از اطلاعات اولیه‌ی تصویر یعنی مکان هسته، استفاده شده است تا مواردی که در تصویر باینری خروجی تابع اوتسو وجود دارند و انگل به شمار نمی‌آیند، حذف شود. به عبارت دیگر، میزان خطای الگوریتم استخراج مرز اوتسو، برای سطوح ۲ تا ۱۰ و فقط برای انگل‌ها محاسبه شده است. شکل ۴ نشان دهنده‌ی میزان میانگین خطاهای استخراج مرز محاسبه شده در هر سطح می‌باشد. در این نمودار، محور افقی نشان دهنده‌ی سطح آستانه‌گذاری و محور عمودی میزان میانگین خطاهای محاسبه شده در هر سطح است.

با توجه به نمودارهای قبل، حداقل میانگین خطا در سطح پنج اتفاق می‌افتد. از این رو، از سطح پنج در آستانه‌گذاری به روش اوتسو، استفاده می‌شود. در

با گام مشخص)، برای تک تک تصاویر موجود بررسی شده است. لازم به ذکر است که در این روش نیز از اطلاعات اولیه‌ی تصویر یعنی مکان هسته، استفاده شده است تا مواردی که در تصویر باینری خروجی وجود دارد و انگل به شمار نمی‌آید، حذف شود. به عبارت دیگر، میزان خطای محاسبه شده‌ی الگوریتم استخراج مرز به روش آستانه‌گذاری ساوولا، برای مقادیر آستانه‌ی مختلف، ماسک‌های اولیه‌ی متفاوت و فقط برای انگل‌ها می‌باشد.

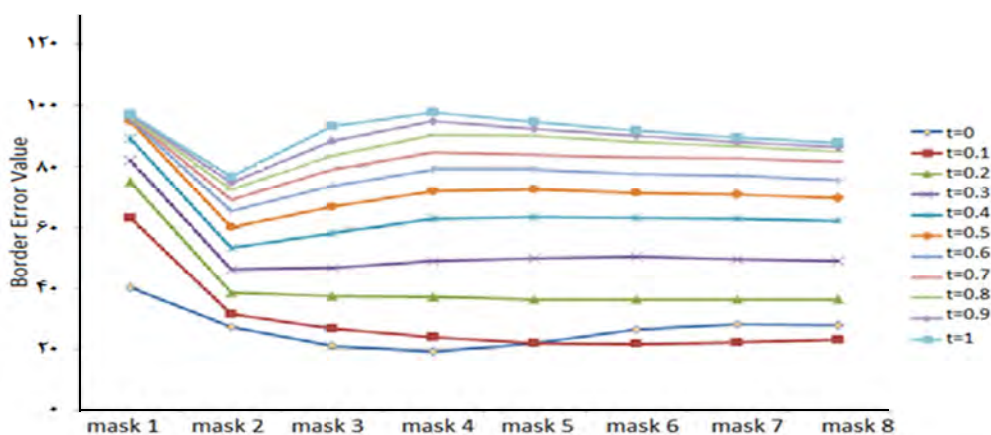
شکل ۶ نشان دهنده‌ی نتیجه‌ی حاصل از این بررسی برای یک تصویر می‌باشد. با توجه به نمودار موجود در شکل ۶، واضح است که در مقادیر آستانه‌ی صفر تا ۰/۲ و ماسک‌های اولیه‌ی ۳-۶ کمترین میزان خطا برای این تصویر رخ داده است. با بررسی نمودار مربوط به تمام تصاویر، کمترین میزان خطا در بین مقادیر آستانه ۰/۱-۰/۲ با ماسک‌های اولیه‌ی ۳-۶ به دست آمد. از این رو، بین مقادیر آستانه‌ی ۰/۱-۰/۲ و ماسک‌های اولیه‌ی ۳-۶، برای انتخاب بهترین مقدار آستانه و مناسب‌ترین ماسک نمودار میانگین خطا برای تمام تصاویر موجود برای ماسک‌های ۳-۶ و سطح آستانه‌های ۰/۱-۰/۲ رسم شد. شکل ۷، نتیجه‌ی

حاصل از این بررسی را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار موجود در شکل ۷، در مقدار آستانه‌ی ۰/۱ و با ماسک پنجم کمترین میزان خطا رخ می‌دهد. از این رو برای بررسی بخش‌بندی به روش آستانه‌گذاری ساوولا، از مقدار آستانه‌ی ۰/۱ و ماسک اولیه‌ی ۵ استفاده می‌شود. در شکل ۸، نمونه‌هایی از نتایج این آستانه‌گذاری آمده است.

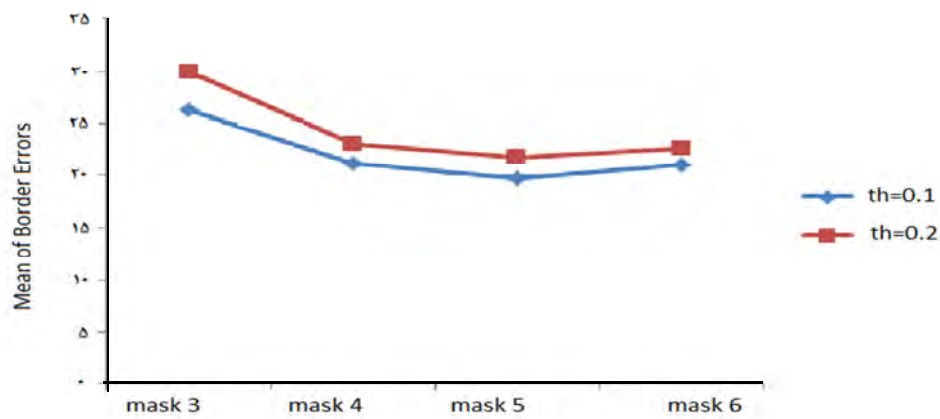
در شکل ۸، در هر تصویر، منحنی سبز رنگ مرزی است که توسط پزشک متخصص به صورت دستی تعیین شده و منحنی قرمز رنگ، مرز استخراج شده با روش آستانه‌گذاری ساوولا است.

ج- خوشه‌بندی k-میانگین

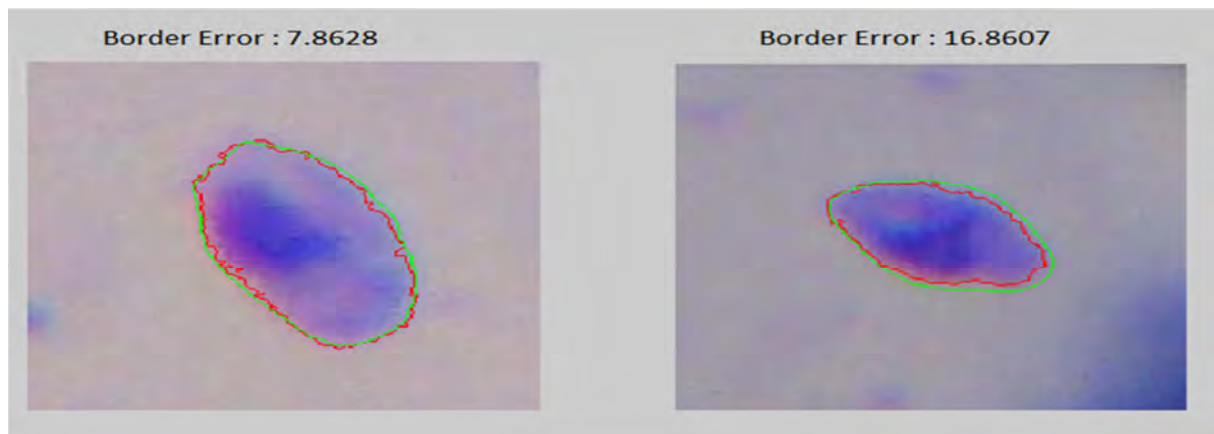
در این قسمت برای تعداد خوشه‌ی ۲ تا ۶ در روش k-میانگین عملیات خوشه‌بندی انجام شده است و با هر تعداد خوشه‌ی تعیین شده، میزان خطای استخراج مرز به دست آمده است. شکل ۹ نشان دهنده‌ی میزان میانگین خطاهای استخراج مرز محاسبه شده در هر خوشه می‌باشد. در این شکل، محور افقی بیانگر تعداد خوشه و محور عمودی میزان میانگین خطاهای محاسبه شده در هر خوشه را نشان می‌دهند.



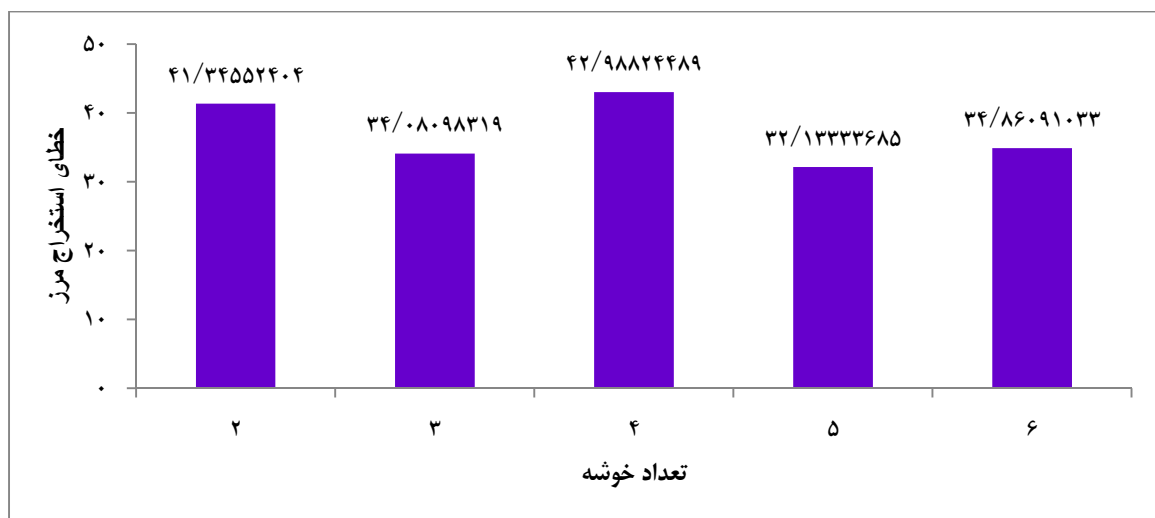
شکل ۶. میزان تغییرات خطای مرز استخراج شده با توجه به افزایش مقدار آستانه و اندازه‌ی ماسک اولیه در روش ساوولا



شکل ۷. نمودار میانگین خطای استخراج مرز حاصل از اعمال روش آستانه‌گذاری ساوولا بر روی تمام تصاویر برای دو مقدار آستانه‌ی ۰/۱، ۰/۲، ماسک‌های ۳ تا ۶



شکل ۸. مقایسه‌ی مرز استخراج شده توسط روش آستانه‌گذاری ساوولا با مرز تعیین شده توسط پزشک متخصص. میزان خطای محاسبه شده برای هر تصویر بر حسب درصد بیان شده است.



شکل ۹. میانگین خطای استخراج مرز محاسبه شده در خوشه‌های ۲ تا ۶

بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک جسم لیژمن می‌باشند و توسط روش به درستی به عنوان جسم لیژمن شناخته شده‌اند. مثبت کاذب (Tn یا True negative) بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک جسم لیژمن نمی‌باشند و توسط روش به درستی به عنوان جسم لیژمن شناخته نشده‌اند. منفی درست (Fp یا False positive) بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک جسم لیژمن نمی‌باشند و توسط روش به اشتباه به عنوان جسم لیژمن شناخته شده‌اند و منفی کاذب (Fn یا False negative) بیانگر تعداد کاندیدهایی هستند که با توجه به نظر پزشک، جسم لیژمن می‌باشند و توسط روش به اشتباه به عنوان جسم لیژمن شناخته نشده‌اند.

نسبت احتمال تشخیص (DOR) یا Diagnosis odds ratio) نسبتی است که احتمال مثبت بودن بیماری را به احتمال مثبت بودن عدم بیماری بررسی می‌کند و به صورت رابطه‌ی (۲۲) تعریف می‌شود (۱۵):

$$DOR = \frac{\left(\frac{Tp}{Fn}\right)}{\left(\frac{Fp}{Tn}\right)} = \left(\frac{Sens}{1-Sens}\right) / \left(\frac{1-Spec}{Spec}\right) \quad (22)$$

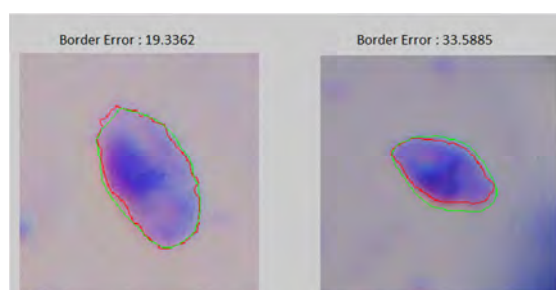
هر چه مقدار DOR بیشتر از یک باشد، دلیل بر میزان تشخیص صحیح‌تر است.

بحث

شکل ۱۱ میانگین خطای مرزهای استخراج شده توسط سه روش آستانه‌گذاری اوتسو، آستانه‌گذاری ساوولا و k-میانگین را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، روش ساوولا کمترین میانگین خطا را دارد.

همان‌طور که در شکل ۹ آمده است، تعداد خوشه‌ی برابر با ۵، کمترین مقدار میانگین خطا را دارد؛ از این رو، در مطالعه‌ی حاضر از ۵ خوشه استفاده شد. در زیر نمونه‌هایی از نتایج این خوشه‌بندی دیده می‌شود.

در شکل ۱۰ در هر تصویر، منحنی سبز رنگ مرزی است که توسط پزشک متخصص به صورت دستی تعیین شده است و منحنی قرمز رنگ، مرز استخراج شده با روش k-میانگین می‌باشد.



شکل ۱۰. مقایسه‌ی مرز استخراج شده توسط روش k-میانگین با مرز تعیین شده توسط پزشک متخصص. میزان خطای محاسبه شده برای هر تصویر، بر حسب درصد بیان شده است.

نتایج حاصل از شناسایی جسم لیژمن

جهت بررسی آماری، خروجی روش‌های بررسی شده، خروجی هر روش به صورت جداگانه با نظر پزشک متخصص مقایسه و معیارهای ارزیابی از قبیل حساسیت (Sensitivity)، ویژگی (Specificity) و دقت (Accuracy) محاسبه شد. این مقادیر با استفاده از روابط (۱۹)، (۲۰) و (۲۱) به دست می‌آیند (۱۵):

$$Sensitivity = \frac{Tp}{Tp+Fn} \quad (19)$$

$$Specificity = \frac{Tn}{Tn+Fp} \quad (20)$$

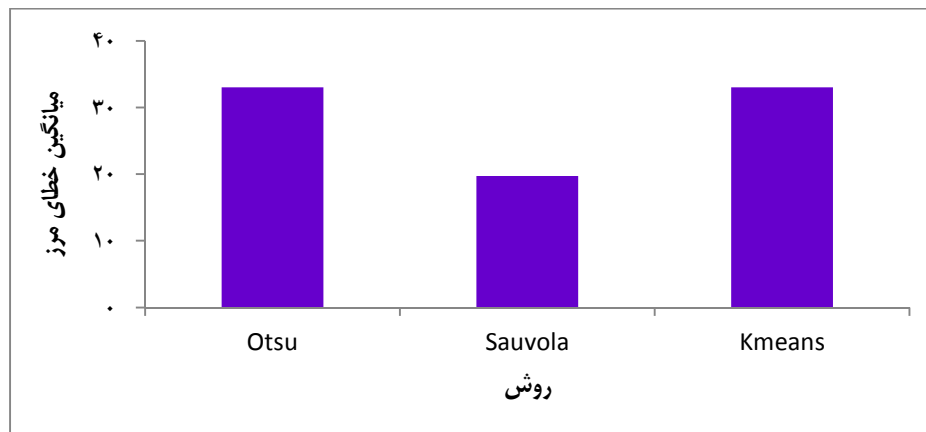
$$Accuracy = \frac{Tp+Tn}{Tp+Fp+Tn+Fn} \quad (21)$$

که در آن مثبت درست (Tp یا True positive)

اوتسو بیشترین دقت را دارد و با توجه به نسبت تشخیص صحیح، مشاهده می‌شود که روش اوتسو نسبت به سایر روش‌های بررسی شده، کاراتر است.

همچنین در قسمت شناسایی جسم لیشمن، با توجه به نتایج حاصل از شناسایی جسم لیشمن توسط سه روش بررسی شده، جدول ۱ حاصل شد.

با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود که روش



شکل ۱۱. میانگین خطای مرزهای استخراج شده توسط سه روش مورد بررسی

جدول ۱. مقایسه‌ی نتایج شناسایی جسم لیشمن در سه روش مورد بررسی

روش	نسبت احتمال تشخیص	ویژگی درصد	حساسیت درصد	دقت درصد
Otsu	۱۳/۷۲	۹۳/۲۰	۵۰/۰۰	۸۳/۹۸
Sauvola	۷/۴۴	۸۶/۲۰	۵۴/۳۴	۷۹/۵۴
K-means	۹/۳۴	۸۸/۲۰	۵۵/۰۰	۸۱/۶۱

References

- Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 5th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007.
- Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. Am Fam Physician 2004; 69(6): 1455-60.
- World Health Organization. Strategic Direction for Research: Leishmaniasis [Online]. [cited 2002 Feb]; Available from: URL: www.who.int/tdr
- Talari SA, Sadr F. Treatment of cutaneous Leishmaniasis: effectiveness, and adverse effects of the drugs. Feyz 2001; 5(1): 85-94. [In Persian].
- Pagadala P. Tumor border detection in epiluminescence microscopy images [Thesis]. Columbia, MO: Department of Electrical and Computer Engineering, University of Missouri 1998.
- Schmid P. Segmentation of digitized dermatoscopic images by two-dimensional color clustering. IEEE Trans Med Imaging 1999; 18(2): 164-71.
- Erkol B, Moss RH, Stanley RJ, Stoecker WV, Hvatum E. Automatic lesion boundary detection in dermoscopy images using gradient vector flow snakes. Skin Res Technol 2005; 11(1): 17-26.
- Cucchiara R, Grana C, Seidenari S, Pellacani G. Exploiting color and topological features for region segmentation with recursive fuzzy C-

- means. *Machine Graphics & Vision International Journal* 2002; 11(2-3): 169-82.
9. Wan Y, Shi D. Joint exact histogram specification and image enhancement through the wavelet transform. *IEEE Trans Image Process* 2007; 16(9): 2245-50.
 10. Otsu N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Systems, Man, and Cybernetics Society* 1979; 9(1): 62-6.
 11. Sauvola J, Pietikäinen M. Adaptive document image binarization. *Pattern Recognition* 1999; 33(2000): 225-36.
 12. Alpaydin E. Introduction to machine learning. Cambridge MA: The MIT Press; 2004.
 13. Gonzalez R, Woods R, Eddins S. Digital image processing using MATLAB. 2nd ed. Knoxville, TN: Gatesmark Publishing; 2009.
 14. Celebi ME, Kingravi HA, Iyatomi H, Aslandogan YA, Stoecker WV, Moss RH, et al. Border detection in dermoscopy images using statistical region merging. *Skin Res Technol* 2008; 14(3): 347-53.
 15. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossuyt PM. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003; 56(11): 1129-35.

Automatic Boundary Extraction of Leishman Bodies in Bone Marrow Samples from Patients with Visceral Leishmaniasis

Maria Farahi¹, Hossein Rabbani PhD², Ardeshir Talebi MD³

Original Article

Abstract

Background: According to the progress of microscopic imaging technology and suitable image processing techniques in the past decade, there is a tendency to use computer for automatic diagnosis of microscopic diseases. Automatic border detection is one of the most important steps in computer diagnosis that accuracy and specificity of the subsequent steps crucially depends on it. Microscopic images are colored to be seen more accurate and easier; after coloring, the image artifacts increases, so the boundary detection of objects is very important in order to find the exact feature extraction.

Methods: In this study, leishman bodies existed in microscopic images taken from bone marrow samples of patients with visceral leishmaniasis underwent automatic-segmentation using Otsu and Savoulla thresholding methods besides K-means clustering method. For data acquisition, a digital camera (Sony DSC-H9) coupled on an optical microscope (Olympus-CH40RF200) were used. Proposed method was tested on 20 images. For automatic diagnosis of the leishman bodies from all found objects, some geometric features like eccentricity, area ratio, roundness and solidity and some texture features like mean, variance, smoothness, third moment, uniformity and entropy were extracted. Found objects were classified into healthy and non-healthy groups using Feed-Forward Neural Network classifier.

Findings: To find the best mode for each method, a comparison were made and determined that using stage 5 for Otsu, threshold 0.1 for Sauvola and 5 clusters for k-means had minimum automatic boundary extraction error.

Conclusion: After comparison of obtained result with specialist, we found that Sauvola method had minimum error of border detection, and Otsu method was more accurate for automatic detection of leishman bodies.

Keywords: Automatic disease diagnosis, Visceral leishmaniasis, Leishman body, Segmentation, Border detection

Citation: Farahi M, Rabbani H, Talebi A. **Automatic Boundary Extraction of Leishman Bodies in Bone Marrow Samples from Patients with Visceral Leishmaniasis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(286): 726-39

* This paper is derived from a MSc thesis No. 392269 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Bioelectrical Engineering, School of Advanced Medical Technology AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Bioelectrical Engineering, School of Advanced Medical Technology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hossein Rabbani PhD, Email: h_rabbani@med.mui.ac.ir

مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های بر پایه‌ی ابریشم بر تمایز کندروسیت‌های خرگوشی

میترا نعیمی^۱، دکتر محمدحسین فتحی^۲، دکتر محمد رفیعی‌نیا^۳، دکتر شاهین بنکدار^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آرتروز به دلیل آسیب به مفاصل در میان افراد کهنسال و نیز ورزشکاران شایع است که منجر به درد، شکنندگی، محدودیت حرکتی و تورم بافت می‌شود. در بازتولید غضروف به روش مهندسی بافت، استفاده از داربست مناسب برای حفظ تمایز سلولی ضروری می‌باشد؛ زیرا کندروسیت‌هایی که به صورت تک لایه کشت داده می‌شوند، تمایز غضروفی خود را از دست می‌دهند. هدف از پژوهش حاضر، مقایسه‌ی حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌های جدا شده از بافت غضروف خرگوشی در داربست ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بود.

روش‌ها: داربست ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات به روش خشکاندن انجمادی تهیه گردید. ساختار داربست‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. کندروسیت از بافت غضروف مفصلی خرگوش استخراج شد و در داربست‌های تهیه شده به مدت ۱۴ روز کشت داده شد. درصد بقای سلولی توسط روش MTT [۳-(۵,۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵,۲-diphenyltetrazolium bromide] اندازه‌گیری شد. برای بررسی ترشح گلیکوزآمینوگلیکان از روش رنگ‌آمیزی Alcian blue و برای بررسی میزان بیان ژن کلاژن نوع II از Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) استفاده گردید.

یافته‌ها: مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی به هم پیوستگی تخلخل‌ها را در داربست کامپوزیتی نشان داد. نتایج آزمون MTT، عدم سمیت سلولی داربست‌های تهیه شده را تأیید کرد. میزان ترشح گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و نیز میزان بیان کلاژن نوع II با تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در داربست کامپوزیتی بیشتر بود ($P < 0/050$).

نتیجه‌گیری: داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات برای حفظ تمایز کندروسیت‌ها بسیار مناسب‌تر از داربست ابریشم و یا کشت تک لایه‌ی کندروسیت‌ها می‌باشد.

واژگان کلیدی: غضروف، مهندسی بافت، کندروسیت

ارجاع: نعیمی میترا، فتحی محمدحسین، رفیعی‌نیا محمد، بنکدار شاهین. مقایسه‌ی تأثیر داربست‌های بر پایه‌ی ابریشم بر تمایز کندروسیت‌های خرگوشی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ۷۴۰-۷۵۱

مقدمه

تخصص یافته به نام کندروسیت است (۱). کندروسیت‌ها سلول‌های کوچکی با هسته‌ی بیضی شکل هستند که یک یا دو هسته دارند. کندروسیت‌ها در درون ماتریکس خارج سلولی قرار

۸۰-۶۵ درصد بافت غضروف مفصلی، سیال و ۳۵-۲۰ درصد ماتریکس خارج سلولی متشکل از کلاژن و پروتئوگلیکان و نیز سلول‌های بسیار

۱- دانشجوی دوره‌ی مشترک دکترای تخصصی، گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده‌ی مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه پژوهشی بیومواد، دانشکده‌ی مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان و مرکز تحقیقات مواد دندان، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوسنسور، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

Email: m.naeimi@ma.iut.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: میترا نعیمی

گرفته‌اند. در مورد بافت غضروفی که دچار آرتروز شده است، کندروسیت‌ها رفتاری متفاوت با کندروسیت‌های بالغ طبیعی دارند. در پی بروز عارضه‌ی آرتروز، توانایی کندروسیت‌ها در حفظ تعادل بین فعالیت‌های آنابولیکی (تولید ماتریکس) و کاتابولیکی (تخریب ماتریکس) به خطر می‌افتد.

در واقع، در مراحل اولیه‌ی بیماری، فعالیت تولیدی زیادتر می‌شود؛ اما با این وجود، کندروسیت‌ها قادر به جبران آسیب به ماتریکس نیستند. به علاوه، کندروسیت‌ها نقشی مستقیم در تخریب ماتریکس با تنظیم نمودن بیان آنزیم‌های تخریب‌کننده‌ی ماتریکس دارند. تغییرات دیگری مانند تغییر در میزان حضور کلاژن نسبت به غضروف طبیعی نیز در نتیجه‌ی بیماری آرتروز رخ می‌دهد (۲-۴).

بنا به تعریف، مهندسی بافت رشته‌ای است که از ترکیب علم بیولوژی مواد و علم مهندسی جهت بیان ارتباطات ساختاری بافت‌های فیزیولوژیکی و طبیعی پستانداران در راستای توسعه‌ی روش‌های نوین ترمیم بافت و جایگزین‌سازی بافت، پیشرفت نموده است (۵). به عبارت دیگر، مهندسی بافت را می‌توان به شکل بیولوژیکی، شیمیایی و با استفاده از اصول مهندسی در جهت ترمیم یا بازسازی بافت‌های زنده با به کارگیری زیست مواد، سلول‌ها و عوامل بیولوژیکی مورد استفاده قرار داد. از پلیمرها به طور گسترده در مهندسی بافت برای بازسازی بافت‌های زنده استفاده می‌شود (۶-۷).

در مورد سلول، شناسایی منبع مناسبی از سلول‌ها، اولین قدم می‌باشد. کندروسیت‌ها از این نظر که در غضروف طبیعی یافت می‌شوند، بهترین گزینه هستند. کندروسیت‌های تمایز یافته، مورفولوژی کروی دارند و با توجه به تولید مولکول‌های موجود در ماتریکس

خارج سلولی مانند کلاژن نوع II و گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفات، شناسایی می‌شوند. کندروسیت‌های مفصلی در بررسی و آزمون برون تنی به کندی تکثیر می‌شوند و در طی کشت به صورت تک لایه، ناپایدار می‌گردند و تمایز خود را از دست می‌دهند و بافتی با استحکام مکانیکی کم تولید می‌کنند (۵، ۲). کندروسیت‌هایی که تمایز خود را از دست داده‌اند، مشابه سلول‌های فیروبلاست، دوکی شکل هستند و بیان کلاژن نوع I در آن‌ها زیاد است. در حالی که کلاژن نوع II و پروتئوگلیکان ندارند (۷). بازتولید بافت از بین رفته توسط مهندسی بافت نیاز به یک داربست متخلخل موقتی دارد. در این پژوهش، به منظور کاهش از دست رفتن تمایز سلول‌های کندروسیت در طی کشت، از داربست‌های سه بعدی پلیمری استفاده شده است.

در فرایند مهندسی بافت، سلول‌ها بر روی یک بستر زیست تخریب‌پذیر با حجم تخلخل بالا استقرار می‌یابند، رشد می‌کنند و تکثیر می‌شوند. یکی از اساسی‌ترین قسمت‌های مهندسی بافت، داربست‌های زیست تخریب‌پذیر هستند. این داربست‌ها، در حقیقت بستری متخلخل با ساختاری شبیه به ماتریکس خارج سلولی بافت هستند که رشد سلول را به سمت تشکیل بافت مورد نظر جهت می‌دهند (۸).

شناخت ساختمان شیمیایی و روش ساخت این داربست‌ها، نقش مهمی را در تعیین خواص فیزیکی این مواد دارد. از انواع مواد مورد استفاده در ساخت داربست، می‌توان به پلیمرهای طبیعی و مصنوعی اشاره کرد. پلیمرهای طبیعی مورد استفاده در مهندسی بافت غضروف عبارت از آلژینات، آگاروز، کیتوسان، کلاژن، هیالورونان، فیبرین و ابریشم هستند (۹-۱۵).

در این میان، ابریشم زیست ماده‌ای از جنس پروتئین است که کاربردهای فراوانی در پزشکی دارد (۲۲-۱۶). فیبروئین ابریشم از نظر خواص مکانیکی، قابلیت استفاده برای مهندسی بافت‌های ساختاری بدن را دارد. فیبروئین ابریشم در مهندسی بافت غضروف مورد توجه قرار گرفته است. فیبروئین ابریشم در بدن به آهستگی تخریب می‌گردد (۲۴-۲۳). به همین دلیل می‌توان آن را با مواد دیگر مانند کلاژن، کیتوسان، هیالورونیک اسید و آلژینات تلفیق نمود (۳۱-۲۵).

ماتریکس خارج سلولی طبیعی غضروف از الیاف کلاژن و پروتئوگلیکان‌هایی مانند کندروئیتین سولفات و هیالورونیک اسید تشکیل شده است (۷). اما استفاده‌ی درمانی وسیع از کلاژن و این پروتئوگلیکان‌ها به صورت بالینی به دلیل گران قیمت بودن محدود است. به علاوه، به دلیل خواص مکانیکی پایین، استفاده از آن‌ها به تنهایی در داربست‌های مهندسی بافت غضروف مطلوب نمی‌باشد. در پژوهش حاضر، داربست ابریشم خالص و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات با هدف استفاده به عنوان داربست مهندسی بافت غضروف، تولید شد و حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌های جدا شده از بافت غضروف خرگوشی در دو نوع داربست با هم مقایسه شد.

ماتریکس خارج سلولی طبیعی غضروف از الیاف کلاژن و پروتئوگلیکان‌هایی مانند کندروئیتین سولفات و هیالورونیک اسید تشکیل شده است (۷). اما استفاده‌ی درمانی وسیع از کلاژن و این پروتئوگلیکان‌ها به صورت بالینی به دلیل گران قیمت بودن محدود است. به علاوه، به دلیل خواص مکانیکی پایین، استفاده از آن‌ها به تنهایی در داربست‌های مهندسی بافت غضروف مطلوب نمی‌باشد. در پژوهش حاضر، داربست ابریشم خالص و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات با هدف استفاده به عنوان داربست مهندسی بافت غضروف، تولید شد و حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌های جدا شده از بافت غضروف خرگوشی در دو نوع داربست با هم مقایسه شد.

در این پژوهش، دو نوع داربست تهیه شد که شامل داربست خالص ابریشم و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بود. به منظور ساخت داربست خالص ابریشم، محلول آبی ابریشم تولید شده با غلظت ۶ درصد وزنی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ساخت داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات، پودر آلژینات در محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد و پودر کندروئیتین سولفات در آب مقطر حل شد. سپس محلول آبی ابریشم با محلول کندروئیتین سولفات و آلژینات با نسبت وزنی ۵:۱:۱ مخلوط گردید.

محلول‌های همگن تهیه شده در قالب‌های استوانه‌ای با قطر ۶ میلی‌متر ریخته شدند و به مدت ۷۲ ساعت در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی در ۵۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت در

در این میان، ابریشم زیست ماده‌ای از جنس پروتئین است که کاربردهای فراوانی در پزشکی دارد (۲۲-۱۶). فیبروئین ابریشم از نظر خواص مکانیکی، قابلیت استفاده برای مهندسی بافت‌های ساختاری بدن را دارد. فیبروئین ابریشم در مهندسی بافت غضروف مورد توجه قرار گرفته است. فیبروئین ابریشم در بدن به آهستگی تخریب می‌گردد (۲۴-۲۳). به همین دلیل می‌توان آن را با مواد دیگر مانند کلاژن، کیتوسان، هیالورونیک اسید و آلژینات تلفیق نمود (۳۱-۲۵).

ماتریکس خارج سلولی طبیعی غضروف از الیاف کلاژن و پروتئوگلیکان‌هایی مانند کندروئیتین سولفات و هیالورونیک اسید تشکیل شده است (۷). اما استفاده‌ی درمانی وسیع از کلاژن و این پروتئوگلیکان‌ها به صورت بالینی به دلیل گران قیمت بودن محدود است. به علاوه، به دلیل خواص مکانیکی پایین، استفاده از آن‌ها به تنهایی در داربست‌های مهندسی بافت غضروف مطلوب نمی‌باشد. در پژوهش حاضر، داربست ابریشم خالص و داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات با هدف استفاده به عنوان داربست مهندسی بافت غضروف، تولید شد و حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌های جدا شده از بافت غضروف خرگوشی در دو نوع داربست با هم مقایسه شد.

روش‌ها

تهیه‌ی داربست‌ها

برای انجام این مطالعه، فیبروئین ابریشم از پیلای کرم ابریشم (خریداری شده از شرکت پرورش کرم ابریشم ایران) استخراج گردید. همچنین کندروئیتین سولفات و سدیم آلژینات با وزن مولکولی کم از شرکت سیگمای

بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، سرم جنینی گاوی و ۱۰۰ میلی‌گرم آنزیم کلاژناز A تهیه گردید و برای استریل نمودن از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد.

محیط تهیه شده به نمونه افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سلول‌ها در شتاب ۲۵۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا به شکل پلت تبدیل شوند (۳۲). محیط رویی خارج شد و محیط کشت جدید حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۲ Ham's F به سلول‌ها افزوده شد. سلول‌ها توسط این محیط باز شدند و در پلیت کشت سلولی ریخته شده و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۲ روز یک بار تعویض گردید.

عصاره‌گیری از داربست‌ها

داربست‌های تولید شده با قرارگیری در دستگاه پرتو فرابنفش (UV یا Ultra violet) به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند. به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری بر اساس استاندارد ایزو ۵-۱۰۹۹۳ انجام شد که طی آن به هر نمونه با سطح مقطع $0.5 \pm 3/5$ سانتی‌متر مربع، مقدار ۱ میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. مقدار مشخصی محیط کشت نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

شرایط محیط عصاره‌گیری تا حد امکان مشابه با شرایط محیط بدن، در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انتخاب شد. بعد از گذشت ۳ روز، محیط روی داربست‌ها خارج و از آن برای تعیین سمیت سلولی داربست‌ها استفاده گردید.

آزمون ارزیابی سمیت سلولی

محلول کربودی‌ایمید (EDC) یا (۳-dimethylaminopropyl carbodiimide) (۳-ethyl-1) (شرکت Merck آلمان) با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و محلول N-هیدروکسی سوکسین ایمید (NHS) یا (N-Hydroxysuccinimide) (شرکت Merck آلمان) با غلظت ۲۵ میلی‌مولار غوطه‌ور شدند. بعد از شستشو توسط بافر فسفات (PBS) یا (Phosphate buffered saline)، داربست‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار داده شدند.

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور بررسی مورفولوژی و ریزساختار داربست‌ها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Hitachi S ۴۱۶۰، Cold Field) استفاده گردید. سطح مقطع داربست‌ها قبل از تهیه‌ی تصویر توسط لایه‌ی نازکی از طلا پوشش‌دهی شد.

جداسازی سلول‌های کندروسیت خرگوشی

حیوانات مختلفی نظیر خرگوش، خوک، سگ، اسب و غیره در تحقیقات مربوط به غضروف و کندروسیت مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش کلی کار به این صورت بود که در ابتدا قطعاتی از غضروف توسط برش از غضروف مفصل پای خرگوش جداسازی گردید. قطعات غضروفی برش خورده پس از خارج شدن از بدن و شستشو توسط PBS، به ظرف محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین منتقل شدند. سپس مایع خارج شد تا قطعه‌ی غضروفی در ته ظرف ته‌نشین گردید. فرایند افزودن محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک چندین بار انجام گرفت. سپس محیط DMEM حاوی آنتی

رنگ آمیزی انجام پذیرفت و در نهایت، نمونه‌ها توسط اسید استیک ۳ درصد شستشو داده شدند (۳۲، ۸). داربست‌های فاقد سلول نیز از هر دو گروه به عنوان شاهد رنگ آمیزی شدند.

آنالیز بیان ژن

سوسپانسیون سلولی با غلظت $10^4 \times 2$ سلول در هر میلی‌لیتر به داربست‌ها اضافه شد و صفحه‌ی کشت به مدت ۱۴ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار داده شد. به منظور مطالعه‌ی عملکرد کندروسیت‌ها، ژن کلاژن نوع II موجود در RNA سلول‌ها توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real-time PCR) یا Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) بررسی شد. استخراج RNA سلول‌ها توسط کیت (Qiagen, RNeasy Plus Mini Kit ۵۰) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای تبدیل RNA به cDNA (Complementary DNA) نیز طبق دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت عمل شد. سپس مخلوط ۲ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، ۱۰ میکرولیتر Real-time Master Mix (Takara)، ۶ میکرولیتر آب و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (مستقیم و معکوس) تهیه شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

سپس تنظیم دستگاه ترموسایکلر به گونه‌ای صورت گرفت که ابتدا دما به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد باقی بماند. سپس ۴۰ سیکل با تغییر دمایی ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به ازای هر سیکل به دستگاه اعمال شد. سپس در دستگاه

برای بررسی میزان سمیت سلولی از آزمون دی‌متیل تیازول دی‌فنیل تترازولیم بروماید MTT یا $5,2-(4-Dimethylthiazol-2-yl)-3$ [Sigma] (diphenyltetrazolium bromide) (شرکت Sigma) استفاده شد (۳۲). به این ترتیب که ابتدا $10^4 \times 1$ سلول درون پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی ریخته شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. عصاره‌ی گرفته شده از هر نمونه، به چاهک کشت افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول روی سلول‌ها تخلیه گردید و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه شد و به خوبی پیت گردید. سپس میزان چگالی نوری (OD یا Optical density) نمونه‌ها توسط دستگاه میکروریدر الایزا (STAT FAX-۲۱۰۰) در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۹-۲۲) و درصد بقای سلولی (Viability) محاسبه گردید. چاهک دارای سلول‌های بیشتر، چگالی نوری بالاتری نسبت به چاهک با سلول کمتر نشان می‌دهد.

رنگ آمیزی با Alcian blue

به منظور بررسی کیفی گلیکوز آمینو گلیکان ترشح شده در اطراف سلول‌ها در داربست، رنگ آمیزی با Alcian blue انجام گردید. پس از تثبیت سلول‌ها در داربست‌های حاوی سلول بعد از گذشت ۱۴ روز کشت سلول، آب‌گیری از نمونه‌ها انجام شد. سپس توسط محلول Alcian blue (۰/۰۵ درصد)

Real-time PCR مدل Applied Biosystems ساخت

کشور آمریکا قرار داده شد.

در آزمون‌های کشت سلولی، از کشت تک لایه به عنوان نمونه‌ی شاهد استفاده شد و برای هر نمونه، سه مرتبه تکرار در نظر گرفته شد و از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) برای تحلیل آماری نتایج استفاده گردید.

یافته‌ها

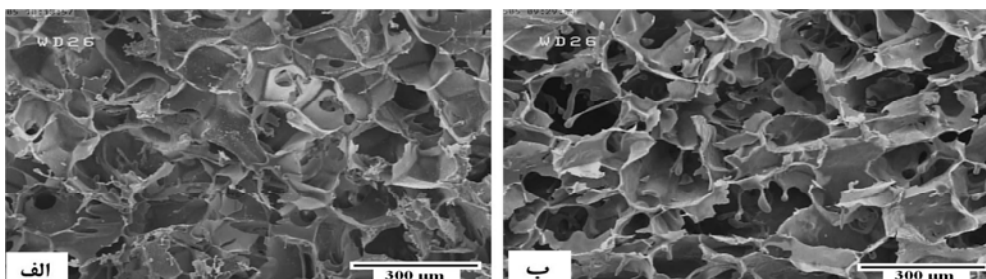
به منظور بررسی مورفولوژی و ریز ساختار داخلی داربست‌های تهیه شده، مطالعه با میکروسکوپ الکترونی روبشی به عمل آمد و تصویر میکروسکوپی لازم از نمونه‌ها تهیه شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات نسبت به داربست ابریشم دارای تخلخل‌های بزرگ‌تری است و داربست ابریشم، ساختاری فشرده‌تر دارد. همچنین ارتباط و به هم پیوستگی تخلخل‌ها در داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات بیشتر از داربست ابریشم است. بنابراین، پیش‌بینی می‌شود که داربست

کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات، حمایت بیشتری از رشد و تکثیر سلول‌ها داشته باشد. در شکل ۲ تصویر میکروسکوپی نوری از سلول‌های کندروسیت استخراج شده از بافت غضروف مفصلی خرگوش نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سلول‌ها بیشتر فضای پلیت را اشغال کرده‌اند. سلول‌ها با مورفولوژی چند ضلعی دیده می‌شوند که این مسأله نشان دهنده‌ی عدم وجود فنوتیپ فیروبلاستی است.

آزمون سمیت سلولی، به منظور بررسی سمیت نمونه‌ها بر میزان زنده ماندن سلول‌ها انجام گرفت. نتایج این آزمون در شکل ۳ آمده است. به عبارت دیگر، از آزمون MTT برای بررسی درصد بقای سلول‌ها تحت تأثیر عصاره‌ی نمونه‌ها استفاده شد تا بتوان معیاری از میزان زیست سازگاری نمونه‌ها به دست آورد. مطابق شکل ۳، داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات در مقایسه با داربست ابریشم خالص و نمونه‌ی شاهد، بالاترین میزان بقا و رشد سلولی را با تفاوت چشمگیر و معنی‌داری از نظر آماری نشان داده است ($P < 0/050$).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی پرایمر	جهت پرایمر
کلاژن نوع II	۵' CAGGCAGAGGCAGGAACTAAC ۳'	مستقیم
	۵' CAGAGGTGTTTGACACGGAGTAG ۳'	معکوس



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی مربوط به داربست‌های تهیه شده، الف: داربست ابریشم و

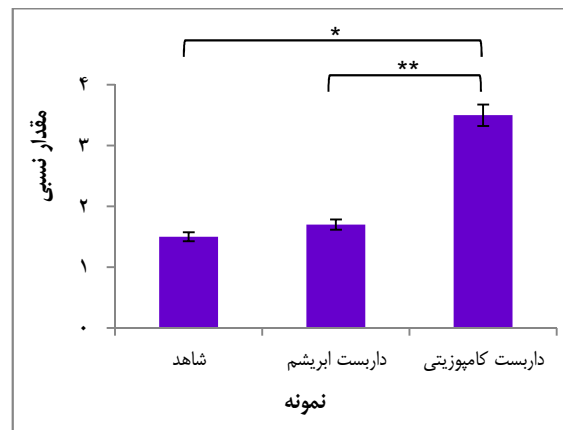
ب: داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات

تحت تأثیر قرار ندهد. عملکرد داربست، هدایت، رشد و مهاجرت سلول‌ها می‌باشد. بنابراین، جنس داربست نقش مهمی در رشد سلول و ایجاد سطح مورد نیاز برای چسبندگی سلولی ایفا می‌کند. در نتیجه، توجه به انتخاب ماده‌ی سازنده‌ی داربست و روش ساخت داربست امری بسیار با اهمیت است.

داربست فیبروئین ابریشم به تنهایی ترد و شکننده است، بنابراین برای کاربردهای مهندسی بافت می‌توان آن را با پلیمرهای آب‌دوست تلفیق نمود. از طرفی، مشخص گردیده است که ماتریکس خارج سلولی طبیعی غضروف از کلاژن و گلیکوز آمینو گلیکان‌هایی مانند کندروئیتین سولفات و هیالورونان تشکیل شده است (۴-۱). بنابراین حضور کندروئیتین سولفات به دلیل مشابه بودن آن با گلیکوز آمینو گلیکان‌ها و آلزینات به عنوان پلیمری آب‌دوست به تولید غضروف کمک خواهد کرد. طبق نتایج حاصل از آزمون MTT، عصاره‌ی داربست‌ها اثر سمیتی بر سلول‌های کشت داده شده نشان نداد.

برای بررسی میزان ترشح ترکیبات ماتریکس خارج سلولی از سلول‌های کندروسیت، می‌توان از رنگ‌های متاکروماتیک نظیر Alcian blue استفاده نمود. در این روش رنگ‌آمیزی، جذب بیشتر رنگ در نمونه، نشان دهنده‌ی ترشح پروتئوگلیکان بیشتر توسط سلول‌های کاشته در آن نمونه است. همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد، داربست کامپوزیتی نسبت به داربست ابریشم خالص، رنگ بیشتری جذب کرده است. بنابراین می‌توان بیان نمود که افزودن کندروئیتین سولفات و آلزینات به فیبروئین ابریشم تأثیری مثبت بر حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌ها داشته است.

در هر دو نوع داربست، ژن کلاژن نوع II بیان شده است. اما میزان بیان ژن در داربست کامپوزیتی ابریشم - کندروئیتین سولفات - آلزینات تفاوت معنی‌داری با میزان بیان ژن در داربست ابریشم خالص و نمونه‌ی شاهد نشان می‌دهد ($P < 0.05$).



شکل ۵. نمودار حاصل از نتایج آنالیز بیان ژن (آزمون

Real-time polymerase chain reaction). مقدار نسبی بیان ژن کلاژن نوع II در داربست ابریشم، داربست کامپوزیتی ابریشم - کندروئیتین سولفات - آلزینات و کشت تک لایه (به عنوان نمونه‌ی شاهد)، پس از گذشت ۱۴ روز کشت سلول‌های کندروسیت جداسازی شده از خرگوش. اختلاف‌های معنی‌دار؛ $P = 0.005$ * و $P = 0.010$ **

بحث

یکی از اساسی‌ترین قسمت‌های مهندسی بافت، داربست‌های زیست تخریب پذیر هستند. داربست‌ها در حقیقت بستری متخلخل می‌باشند که رشد سلول‌ها را به سمت تشکیل بافت مورد نظر جهت می‌دهند (۲۳-۲۵). یک داربست پلیمری مفید برای کاربردهای مهندسی بافت باید چندین ویژگی کلیدی مانند حجم تخلخل بالا، سطح تماس بالا و استحکام ساختاری داشته باشد. فرایند ساخت داربست باید به گونه‌ای باشد که زیست سازگاری ماده‌ی سازنده را

نمی‌دهد. بنابراین، می‌توان بیان نمود که وجود کندروئیتین سولفات و آلژینات در داربست باعث رشد بسیار بهتر کندروسیت‌ها و تولید بهتر بافت غضروفی می‌شود؛ زیرا محیطی مانند ماتریکس خارج سلولی را برای سلول‌ها شبیه‌سازی می‌کند.

بر اساس این مطالعه، داربست ابریشم-کندروئیتین سولفات- آلژینات نسبت به داربست ابریشم جهت حفظ تمایز غضروفی کندروسیت‌ها محیط مناسب‌تری ایجاد می‌نماید. تخلخل‌های موجود در داربست ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات با یکدیگر ارتباط دارند. ترشح گلیکوز آمینو گلیکان‌ها توسط کندروسیت‌ها و نیز بیان ژن‌های غضروفی در این نوع داربست، بسیار بیشتر می‌باشد. بنابراین این نوع داربست می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت غضروف مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس محسن جانملکی، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در انجام این پژوهش یاری دادند و نیز از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که حمایت مالی این پژوهش (شماره‌ی طرح: ۹۱۰۰۳۴۰۸) را به عهده داشتند، سپاسگزاری می‌نماییم.

در پژوهشی محققان داربست‌هایی از ترکیب دو پلیمر ابریشم و هیالورونان تولید کردند (۲۶). هدف از ترکیب کردن این دو پلیمر، استفاده از خواص مکانیکی بهتر ابریشم همراه با به کار بردن خواص بیولوژیکی بهتر هیالورونان بوده است. طبق آزمون‌های انجام شده توسط این محققین، مقدار گلیکوز آمینو گلیکان تولید شده در داربست ابریشم-هیالورونان بسیار بیشتر از داربست ابریشمی خالص بوده است.

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن (شکل ۵) بعد از گذشت ۱۴ روز، به غیر از کشت تک لایه (شاهد)، در هر دو نوع داربست می‌توان بیان ژن کلاژن نوع II را به وضوح مشاهده نمود. اما میزان بیان ژن کلاژن II در داربست کامپوزیتی به طور معنی‌داری از داربست ابریشم خالص بیشتر بوده است. پس داربست کامپوزیتی قابلیت بسیار بیشتری در حفظ حالت تمایز کندروسیتی پس از جداسازی سلول‌های کندروسیت از بافت خرگوش دارا است.

بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که پس از جداسازی سلول‌های کندروسیت و کشت آن‌ها بر روی داربست کامپوزیتی طی ۱۴ روز، تمایز کندروسیتی حفظ می‌گردد و سلول‌ها ژن کندروسیتی (کلاژن نوع II) را بیان می‌نمایند. به عبارت دیگر، در داربست کامپوزیتی ابریشم- کندروئیتین سولفات- آلژینات، از دست رفتن تمایز کندروسیتی رخ

References

1. Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(2): 243-62.
2. Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K, Ichinose S, Hata Y, Muneta T. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 2005; 322(2): 289-98.
3. Doostmohammadi A, Monshi A, Salehi R, Fathi MH, Seyedjafari E, Shafiee A, et al. Cytotoxicity evaluation of 63s bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using human bone-marrow stem cells. *Biomed Pap*

- Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2011; 155(4): 323-6.
4. Karbasi S, Mirzadeh H, Orang F, Urban J. A comparison between cell viability of chondrocytes on a biodegradable polyester urethane scaffold and alginate beads in different oxygen tension and pH. *Iran Polym J* 2005; 14 (9): 823-30.
 5. Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 4th ed. New York, NY: Academic Press; 2013. p. 1-15.
 6. Atala A, Lanza R. Methods of tissue engineering. 1st ed. New York, NY: Academic Press; 2002. p. 1027-36.
 7. Nestic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(2): 300-22.
 8. Bueno EM, Glowacki J. Biologic foundations for skeletal tissue engineering. 1st ed. San Rafael, CA: Morgan and Claypool Publishers; 2011. p. 30-38.
 9. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(16): 3211-22.
 10. De FL, Grigolo B, Roseti L, Facchini A, Fini M, Giavaresi G, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75(3): 612-22.
 11. Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 2007; 28(1): 55-65.
 12. YANG CHUN. Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking. *Bull Mater Sci* 2012; 35(5): 913-8.
 13. Lv Q, Hu K, Feng Q, Cui F. Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: preparation, properties, and cytocompatibility. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84(1): 198-207.
 14. Wenk E, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *J Control Release* 2011; 150(2): 128-41.
 15. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci* 2007; 32(8-9): 991-1007.
 16. Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials* 2006; 27(36): 6064-82.
 17. Zhang X, Reagan MR, Kaplan DL. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(12): 988-1006.
 18. Asakura T, Kuzuhara A, Tabeta R, Saito H. Conformational characterization of Bombyx mori silk fibroin in the solid state by high-frequency carbon-13 cross polarization-magic angle spinning NMR, x-ray diffraction, and infrared spectroscopy. *Macromolecules* 1985; 18(10): 1841-5.
 19. Min BM, Jeong L, Lee KY, Park WH. Regenerated silk fibroin nanofibers: water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. *Macromol Biosci* 2006; 6(4): 285-92.
 20. Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules* 2004; 5(3): 718-26.
 21. Bhardwaj N, Chakraborty S, Kundu SC. Freeze-gelled silk fibroin protein scaffolds for potential applications in soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2011; 49(3): 260-7.
 22. Yan LP, Oliveira JM, Oliveira AL, Caridade SG, Mano JF, Reis RL. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2012; 8(1): 289-301.
 23. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. *Int J Mol Sci* 2009; 10(4): 1514-24.
 24. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(24-25): 3415-28.
 25. Hardy JG, Scheibel TR. Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science* 2010; 35(9): 1093-115.
 26. Hu K, Cui F, Lv Q, Ma J, Feng Q, Xu L, et al. Preparation of fibroin/recombinant human-like collagen scaffold to promote fibroblasts compatibility. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84(2): 483-90.
 27. Gobin AS, Butler CE, Mathur AB. Repair and regeneration of the abdominal wall musculofascial defect using silk fibroin-chitosan blend. *Tissue Eng* 2006; 12(12): 3383-94.
 28. Sionkowska A, Planecka A. Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering. *Journal of Molecular Liquids* 2013; 178(0): 5-14.
 29. Garcia-Fuentes M, Meinel AJ, Hilbe M, Meinel L, Merkle HP. Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30(28): 5068-76.
 30. Yan SQ, Zhang Q, Wang JN, Li MZ. Characterization of silk fibroin/hyaluronic acid blend films cross-linked with EDC. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics* 2010;

- 3(2): 62-7.
31. Ming J, Zuo B. A novel silk fibroin/sodium alginate hybrid scaffolds. *Polym Eng Sci* 2014; 54(1): 129-36.
32. Shokrgozar MA, Bonakdar S, Dehghan MM,

Emami SH, Montazeri L, Azari S, et al. Biological evaluation of polyvinyl alcohol hydrogel crosslinked by polyurethane chain for cartilage tissue engineering in rabbit model. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24(10): 2449-60.

Comparison of the Effect of Silk Fibroin-Based Scaffolds on Differentiation of Rabbit Chondrocytes

Mitra Naeimi MSc¹, Mohammadhossein Fathi PhD², Mohammad Rafienia PhD³,
Shahin Bonakdar PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Osteoarthritis is a degenerative disease arises from damage or trauma to articular cartilage leading to pain, brittleness, and limitation of joint motions and swelling of the tissue. Cartilage damage is common in older people and also athletes. Chondrocytes dedifferentiate in monolayer culture. Tissue engineering involves the use of scaffold in order to keep the differentiation of the cells. In this research, chondrogenic differentiation of the chondrocytes within the pure silk fibroin (SF) and silk fibroin-chondroitin sulfate-alginate (SF-CHS-SA) was studied and compared.

Methods: Pure SF and SF-CHS-SA scaffolds were prepared via lyophilization. The microstructures of the scaffolds were studied via scanning electron microscopy (SEM). Chondrocytes were isolated from the cartilage tissue of rabbit and were cultured within the prepared scaffolds for 14 days. Viability percentage of the chondrocytes was evaluated via MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, using extract of the scaffolds. Glycosaminoglycan (GAG) expression and gene expression of collagen II were studied using alcian blue staining and real time-polymerase chain reaction (PCR), respectively.

Findings: SEM showed that the composite scaffold had higher interconnected pores and pure SF scaffold had mainly closed pores. MTT assay showed no cytotoxicity of the scaffolds. GAG and collagen II expression were higher in the SF-CHS-SA scaffold than the pure SF scaffold ($P < 0.05$).

Conclusion: The SF-CHS-SA scaffold is a suitable substrate for chondrogenic differentiation of the chondrocytes rather than pure SF scaffold or monolayer culture of chondrocytes.

Keywords: Cartilage, Tissue engineering, Chondrocyte

Citation: Naeimi M, Fathi M, Rafienia M, Bonakdar Sh. **Comparison of the Effect of Silk Fibroin-Based Scaffolds on Differentiation of Rabbit Chondrocytes.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(286): 740-51

1- PhD Student, Department of Biomaterials Research, School of Materials Engineering, Isfahan University of Technology AND Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Biomaterials Research, School of Materials Engineering, Isfahan University of Technology AND Dental Materials Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Biosensor Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Mitra Naeimi MSc, Email: m.naeimi@ma.iut.ac.ir

ویژگی‌های بالینی و بقای بیماران مبتلا به سرطان رکتوم

دکتر سیمین همتی^۱، دکتر محمد محمدیان پناه^۲

نامه به سردبیر

سردبیر محترم مجله دانشکده پزشکی اصفهان

در شماره‌ی ۲۴۷ مهر ماه سال ۱۳۹۲ مجله‌ی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان، مقاله‌ای جالب با عنوان «بررسی بقا و عود بیماران مبتلا به سرطان رکتوم در اصفهان» توسط صانعی و همکاران به چاپ رسید (۱). این مقاله‌ی ارزشمند از معدود مقالات چاپ شده با این حجم نمونه در مورد سرطان رکتوم در ایران می‌باشد. به جز مقاله‌ی حاضر، ۲ مقاله‌ی دیگر نیز به طور اختصاصی در مورد میزان بقا و عوامل پروگنوستیک در سرطان رکتوم در مجلات معتبر به چاپ رسیده‌اند (۲-۳).

در یک مطالعه، ندوشن و همکاران، ارزش پروگنوستیک نسبت غدد لنفاوی به کل غدد لنفاوی در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم درمان شده با شیمی درمانی و رادیوتراپی همزمان را مورد بررسی قرار داده است (۲). در مطالعه‌ی دیگر، امیدواری و همکاران نتایج درمانی و میزان بقای دو روش جراحی Low anterior resection و Abdominoperineal resection را در بیماران مبتلا به سرطان رکتوم تحتانی و میانی با هم مقایسه کرده‌اند (۳).

در جدول ۱، ویژگی‌های بالینی و میزان بقای ۵

ساله‌ی بیماران مبتلا به سرطان رکتوم در این سه مطالعه ارایه شده است. با توجه به داده‌های این جدول، متوسط سنی بیماران در مطالعه‌ی ندوشن و همکاران (۲) حدود یک دهه جوان‌تر از دو مطالعه‌ی دیگر است. در هر سه مطالعه، مردان سهم بیشتری را نسبت به زنان از سرطان رکتوم به خود اختصاص داده‌اند که این نسبت در گزارش امیدواری و همکاران (۳) بیشتر از دو مطالعه‌ی دیگر است. تفاوت میزان بقای ۵ ساله‌ی کلی نیز به دلیل توزیع متفاوت مرحله‌ی (Stage) بیماری در سه مطالعه است. در گزارش ندوشن و همکاران (۲)، تنها بیماران مرحله‌ی ۳ مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در مطالعه‌ی صانعی و همکاران (۱)، اکثر (۵۲ درصد) بیماران در مرحله‌ی ۳ و ۴ بیماری قرار داشته‌اند و به همین دلیل، میزان بقای کمتری را نسبت به مطالعه‌ی امیدواری و همکاران (۳) نشان داده‌اند.

در مطالعه‌ی صانعی و همکاران (۱)، اطلاعاتی در مورد تعداد غدد لنفاوی و نسبت غدد لنفاوی مثبت به کل غدد لنفاوی ارایه نشده است. ناکافی بودن یا فقدان غدد لنفاوی در نمونه‌های پاتولوژی، از چالش‌های شایع و مهم در تعیین مرحله‌ی بیماری در سرطان‌های جراحی شده‌ی کولورکتال و به خصوص رکتوم است.

۱- دانشیار، گروه پرتو درمانی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه پرتو درمانی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات کولورکتال، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

(مرحله‌ی ۳ بیماری) هر چه نسبت غدد لنفاوی مثبت به کل غدد لنفاوی برداشته شده بیشتر باشد، میزان بقای کلی و بدون بیماری کمتر خواهد بود (۵).

بر اساس گزارش مرکز ملی ثبت سرطان ایران، سرطان‌های کولورکتال پنجمین سرطان شایع در میان مردان و سومین سرطان شایع در میان زنان می‌باشد (۶). در کشورهای غربی مانند ایالات متحده‌ی آمریکا، سرطان رکتوم حدود ۳۰-۲۵ درصد کل سرطان‌های کولورکتال را به خود اختصاص می‌دهد (۷). اما در ایران، حدود ۵۰-۴۰ درصد کل سرطان‌های کولورکتال از ناحیه‌ی رکتوم منشأ می‌گیرند (۶).

بنابراین، برای دست یافتن به اطلاعات و نتایج کامل‌تر و دقیق‌تر در مورد عوامل پروگنوستیک و میزان‌های بقای بیماران مبتلا به سرطان رکتوم، جمع‌آوری داده‌های مراکز مختلف و نیز مطالعات ملی ضروری به نظر می‌رسد.

در یک مطالعه‌ی مروری، قهرمانی و همکاران نشان دادند که تنها حدود ۴۱ درصد از کل نمونه‌های پاتولوژیک دارای تعداد کافی (۱۲ عدد یا بیشتر) و ۵/۴ درصد آن‌ها فاقد غدد لنفاوی می‌باشند. ناکافی بودن غدد لنفاوی در گزارش‌های داخلی و به خصوص در سرطان رکتوم قابل توجه‌تر است (۴).

همچنین مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تعداد کل غدد لنفاوی برداشته شده و نیز نسبت غدد لنفاوی مثبت به کل غدد لنفاوی برداشته شده از عوامل پروگنوستیک در سرطان‌های جراحی شده‌ی رکتوم می‌باشند (۵، ۳-۲). در یک مطالعه‌ی مروری دیگر، قهرمانی و همکاران نشان دادند که در سرطان‌های کولورکتال با غدد لنفاوی منفی (مرحله‌ی ۱ و ۲ بیماری) هر چه تعداد غدد لنفاوی برداشته شده بیشتر باشد، پیش‌آگهی بیماری بهتر است و میزان بقای کلی و بدون بیماری بیشتر است. همچنین آن‌ها یافتند که در سرطان‌های کولورکتال با غدد لنفاوی مثبت

جدول ۱. ویژگی‌های بالینی و میزان بقای ۵ ساله در سه مطالعه‌ی بزرگ بر روی بیماران مبتلا به سرطان رکتوم در ایران

نویسندگان	استان	تعداد بیماران	میانگین سنی	طیف سنی	نسبت مرد به زن	مرحله‌ی بیماری	میزان بقای ۵ ساله (درصد)
صانعی و همکاران (۱)	اصفهان	۱۰۱	۵۸/۹	۲۲-۸۹	۵۴/۴۷	I-IV	۴۰/۷
ندوشن و همکاران (۲)	تهران	۱۲۸	۴۹/۰	۱۶-۸۵	۶۷/۶۱	III	۳۰/۹
امیدواری و همکاران (۳)	شیراز	۱۵۳	۵۷/۱	۲۳-۸۴	۸۹/۶۴	0-IV	۶۹/۴

ارجاع: همتی سیمین، محمدیان پناه محمد. ویژگی‌های بالینی و بقای بیماران مبتلا به سرطان رکتوم. مجله دانشکده پزشکی اصفهان

۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۶): ۷۵۲-۷۵۵

References

1. Sanei B, Mahmoudieh M, Kolahdouzan M, Mehrabi Koushki A, Ferasat F. Survival time and recurrent rate in patients with rectum cancer. J Isfahan Med Sch 2013; 31(247): 1194-207.
2. Nadoshan JJ, Omranipour R, Beiki O, Zendedel K, Alibakhshi A, Mahmoodzadeh H. Prognostic value of lymph node ratios in node positive rectal cancer treated with preoperative chemoradiation. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(6): 3769-72.
3. Omidvari S, Hamed SH, Mohammadianpanah M, Razzaghi S, Mosalaei A, Ahmadloo N, et al.

- Comparison of abdominoperineal resection and low anterior resection in lower and middle rectal cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* 2013; 25(3): 151-60.
4. Ghahramani L, Razzaghi S, Mohammadianpanah M, Pourahmad S. Adequacy of lymph node staging in colorectal cancer: analysis of 250 patients and analytical literature review. *Ann Colorectal Res* 2013; 1(1): 3-11.
 5. Ghahramani L, Moaddabshoar L, Razzaghi S, Hamed SH, Pourahmad S, Mohammadianpanah M. Prognostic value of total lymph node identified and ratio of lymph nodes in resected colorectal cancer. *Ann Colorectal Res* 2013; 1(3): 81-91.
 6. Pourhoseingholi MA, Zali MR. Colorectal cancer screening: Time for action in Iran. *World J Gastrointest Oncol* 2012; 4(4): 82-3.
 7. Gatta G, Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Hakulinen T, Moller H, et al. Differences in colorectal cancer survival between European and US populations: the importance of sub-site and morphology. *Eur J Cancer* 2003; 39(15): 2214-22.

Clinical Characteristics and Survival of Patients with Rectal Cancer

Simin Hemati¹, Mohammad Mohammadianpanah MD²

Letter to Editor

Abstract

In the issue No. 247 (October 2013) of Journal of Isfahan Medical School, an interesting article entitled “Survival time and recurrent rate in patients with rectum cancer” was reported by Sanei et al. That study was one of the largest reports of rectal cancer from Iran. It provided valuable information regarding the characteristics and oncologic outcomes of the patients with rectal cancer in Isfahan province. Furthermore, 2 other recently published reports from the Tehran and Shiraz investigated the characteristics, prognostic factors and survival of patients with rectal cancer. These two recently published articles specifically focused on the total number and ratio of positive identified lymph nodes, or surgical techniques used in patients with rectal cancer. Sanei et al. did not provide information regarding the total number and ratio of positive identified lymph nodes. Inadequate lymph node evaluation is a common problem in patients with colorectal cancer. The higher number of identified lymph nodes is a favorable prognostic factor and associated with improved disease-free and overall survival in node negative colorectal cancer. On the other hand, higher lymph node ratio is a poor prognostic indicator for overall and/or disease free survival in node positive (stage III) colorectal cancer. Multicenter and national studies are warranted to identify the clinical characteristics and survival of patients with rectal cancer.

Keywords: Rectal cancer, Surgery, Radiotherapy, Chemotherapy, Survival rate, Prognostic factors

Citation: Hemati S, Mohammadianpanah M. **Clinical Characteristics and Survival of Patients with Rectal Cancer.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(286): 752-5

1- Associate Professor, Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Radiation Oncology, School of Medicine AND Colorectal Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Corresponding Author: Mohammad Mohammadianpanah MD, Email: mohpanah@sums.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 printout 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 information 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 \pm 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 Esmail Akbari** MD, Professor of Thoracic Surgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. **Reza Amin** MD, Professor of Pediatrics, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. **Babak Amra** MD, Professor of Pulmonology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6. **Saeid Andalib Jortani** MD, Professor of Pathology, Lewis Weil University, USA
7. **Gholam Reza Askari** MD, PhD of Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
8. **Reza Bagherian-Sararoudi** PhD, Assistant Professor of Psychiatry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
9. **Majid Berekatain** MD, 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 Esmail beigi** MD, Professor of Internal Medicine, School of Medicine, USA
17. **Ziba Farajzadegan** MD, Associate Professor of Community Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
18. **Hamid Fesharaki** Associate Professor of Ophthalmology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
19. **Marjane Foladi** PhD of Nursing, University of Florida, USA
20. **Aziz Gahari** MD, Professor of Dermatology, Dermatology and Leshmaniosis Research Center, Canada
21. **Ali Gheisari** MD, Professor of Cardiovascular Surgery, California, USA
22. **Jafar Golshahi** MD, Associate Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
23. **Ali Mohammad Hanjani** MD, Professor of Cardiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
24. **Mina Hasanrezaei** MD, NeuroImmunology, School of Pharmacy, USA
25. **Saied Morteza Heidari** MD, Associate Professor of Anesthesiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
26. **Mansour karamooz** MD, Professor of Urology, California, USA
27. **Roya Kelishadi** MD, Professor of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
28. **Behnaz Khani** MD, Associate Professor of Obstetrics & Gynecology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
29. **Majid Khazaei** MD, PhD, Associate Professor of Medical Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
30. **Parvin Mahzooni** MD, Associate Professor of Pathology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
31. **Majid Maleki** MD, Professor of Cardiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
32. **Mohammad Mardani** MD, Associate Professor of Medical Anatomy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
33. **Atiye Moghisi** MD, Professor of Endocrinology, Endocrine and Metabolism Research Center, USA
34. **Mehdi Modares** MD, Professor of Ophthalmology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
35. **Hoshang Moein** MD, Professor of Neurosurgery, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
36. **Fereydoun Nouhi** MD, Professor of Cardiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
37. **Mohammadreza Nourbakhsh** Associate Professor of Physiotherapy, USA
38. **Farzin Pourfarzad** Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University MC Rotterdam, The Netherlands
39. **Masoud Pourmoghaddas** MD, Professor of Cardiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
40. **Hassan 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. 286, 3rd week, July 2014

Isfahan University of Medical Sciences

Responsible: **Mansour Sholehvar MD**

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

Editor-in-Chief: **Majid Barekatin 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 indexes

- 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.