

Original Article

The effect of D2 dopaminergic system in nucleus accumbens and glutamatergic system of prelimbic area on anxiety- like behaviors in Wistar male rats.

Hatam Ahmadi^{1*}, Parvin Rostami², Mohammad Reza Zarrindast³, Mohammad Nasehi⁴

¹Department of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran

²Department of Animal Physiology, School of Biology Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

³Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Department of Biology, School of Basic Sciences, Azad University, Garmsar Branch, Iran

*Corresponding author; E-mail: hahmadi@cfu.ac.ir

Received: 21 May 2017 Accepted: 15 February 2017 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):7-13

Abstract

Background: Neurotransmitter systems of dopaminergic and glutamatergic of the prefrontal cortex (PFC) and nucleus accumbens (NAc) are involved in the regulation of anxiety-like behaviors. In addition, the activity of the NAc dopaminergic system is mediated by the glutamatergic inputs, which is mainly from the PFC. This study investigated the role of D2 dopaminergic system in nucleus accumbens and glutamatergic system of prelimbic area on anxiety- like behaviors in male rats.

Methods: This study was performed on four experimental groups in 35 groups of 8 male rats. after 5 days of surgery in a stereotaxic frame, the Elevated Plus maze apparatus was employed for the recording parameters of anxiety-like behaviors due to intra-brain injection of quinpirole (Dopamine receptor agonist), sulpiride (Dopaminergic D2 receptor antagonist), NMDA(NMDA receptor agonist) and D-AP7 (NMDA receptor antagonist).

Results: Unilateral intra- left prelimbic injection of NMDA (0.9 µg/µl) reduced the anxiety-like behaviors ($P<0.01$), which was blocked by D-AP7 injection ($P<0.01$). Also, unilateral infusion of sulpiride (0.4 and 0.6 µg/µl) into the NAc shell induced anxiolytic-like behaviors ($P<0.05$). Furthermore, the administration of the sub threshold dose of sulpiride (0.2 µg/µl) in the NAc shell strengthened the effect of low dose NMDA ($P<0.05$), whereas reduced its high dose ($P<0.01$) in prelimbic.

Conclusion: The results indicate the regulatory effect of the dopamine D2 system of NAc shell on the anxiolytic-like response caused by NMDA injection in prelimbic region.

Keyword: Nucleus accumbens, Prefrontal cortex, Anxiety, Dopaminergic system, Glutamatergic system.

How to cite this article: Ahmadi H, Rostami P, Zarrindast M R, Nasehi M. [The effect of D2 dopaminergic system in nucleus accumbens and glutamatergic system of prelimbic area on anxiety- like behaviors in Wistar male rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2): 7-13. Persian.

مقاله پژوهشی

نقش سیستم دوپامینرژیک D2 هسته آکومبسن و سیستم گلوتاماترژیک ناحیه پری لیمبیک بر رفتارهای شبه اضطرابی در موش‌های صحرایی نر

حاتم احمدی^{۱*}، پروین رستمی^۲، محمد رضا زرین دست^۳، محمد ناصحی^۴

^۱گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران
^۲گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
^۳گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
^۴گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ایران
*نویسنده مسئول: ایمیل: hahmadi@cfu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۳۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۶ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲):۷-۱۳

چکیده

زمینه: سیستم‌های نوروترانسمیتری دوپامینی و گلوتاماتی قشر پری فرونتال و هسته آکومبسن در تنظیم رفتارهای شبه اضطرابی نقش دارند. در ضمن فعالیت سیستم دوپامینی هسته آکومبسن با ورودی‌های گلوتاماتی که عمدتاً از پری فرونتال می‌آید، تنظیم می‌شود. این مطالعه به نقش سیستم دوپامینرژیک D2 هسته آکومبسن و سیستم گلوتاماترژیک ناحیه پری لیمبیک بر رفتارهای شبه اضطرابی در موش‌های صحرایی نر می‌پردازد.

روش کار: این مطالعه بر پایه چهار آزمایش روی ۳۵ گروه ۸ تایی موش‌های صحرایی نر صورت گرفته است. بعد از گذشت ۵ روز از جراحی در دستگاه استریوتاکسی، از دستگاه Elevated Plus Maze برای ثبت رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از تزریق درون مغزی داروهای quinpirole (آگونیست گیرنده D2 دوپامینی)، سولپیراید (آنتاگونیست گیرنده D2 دوپامینی)، NMDA (آگونیست گیرنده NMDA) و D-AP7 (آنتاگونیست گیرنده NMDA) استفاده شد.

یافته‌ها: تزریق یکطرفه NMDA ($0.9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) در پری لیمبیک طرف چپ موجب کاهش رفتارهای شبه اضطرابی شد ($P < 0.01$)، که تزریق D-AP7 در این ناحیه پاسخ ناشی از NMDA را متوقف کرد ($P < 0.01$). همچنین تزریق یکطرفه سولپیراید ($0.4 \text{ و } 0.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) به پوسته آکومبسن موجب بروز رفتارهای شبه اضطراب‌زدا شد ($P < 0.05$). بعلاوه به‌کارگیری دوز بی‌اثر سولپیراید ($0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) در پوسته آکومبسن موجب تقویت اثر دوز پایین NMDA ($P < 0.05$) و کاهش پاسخ دوز بالای آن در پری لیمبیک شد ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر اثر تنظیمی سیستم دوپامینی D2 پوسته آکومبسن بر رفتارهای شبه اضطراب‌زدای ایجاد شده از تزریق NMDA در ناحیه پری لیمبیک می‌باشد.

کلید واژه‌ها: هسته آکومبسن، قشر پری فرونتال، اضطراب، سیستم دوپامینرژیک، سیستم گلوتاماترژیک.

نحوه استناد به این مقاله: احمدی ح، رستمی پ، زرین دست م، ناصحی م. نقش سیستم دوپامینرژیک D2 هسته آکومبسن و سیستم گلوتاماترژیک ناحیه پری لیمبیک بر رفتارهای شبه اضطرابی در موش‌های صحرایی نر. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲):۷-۱۳

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

اضطراب حالت فیزیولوژیک ناخوشایندی است که در آن واکنش بیش از حد به یک وضعیت صورت می‌گیرد. شواهدی وجود دارد که دوپامین نقش مهمی در تعدیل و تنظیم اضطراب در بخش‌های مختلف مغز دارد. محققان نشان داده‌اند که هر دو گیرنده D2 و D1 دوپامینی در تعدیل و تنظیم مهم اضطراب نقش دارند (۱). همچنین سیستم گلو تاماتی به عنوان یکی از سیستم‌های هدف در درمان بیماری‌های اضطراب مطرح است. داروهایی که مسئول تنظیم افزایشی عملکرد گیرنده‌های NMDA هستند ممکن است در درمان رفتاری شناختی برای کنترل اضطراب بکار روند (۲). دو بخش پوسته و مرکزی هسته آکومبیس در پاتوفیزیولوژی افسردگی و اضطراب دارای نقش هستند (۳). نواحی مختلف مغزی و از آن جمله آمیگدال، هیپوکامپ و قشر پری فرونتال که ناحیه پری لیمبیک بخشی از آن به حساب می‌آید در تعدیل و بروز اضطراب دخیل هستند (۱). گزارش شده که اعمال انواع مختلف استرس‌های محدود موجب افزایش آزادسازی دوپامین در پوسته آکومبیس می‌شود (۴). انتقال نورونی دوپامین در هسته آکومبیس با گلو تامات آزاد شده از نورون‌های پری فرونتال میانی تنظیم می‌شود، که این تنظیم به طور مستقیم بر روی نورون‌های خود هسته آکومبیس و یا غیرمستقیم از طریق تگماتوم شکمی صورت می‌گیرد (۵). همچنین آزادسازی دوپامین در پوسته آکومبیس تا حدی وابسته به تحریک همزمان گیرنده‌های NMDA در همین ناحیه است (۶). با توجه به اهمیت نقش سیستم های دوپامینی هسته آکومبیس و گلو تاماتی پری فرونتال میانی در تنظیم و مدیریت ترس، اضطراب و افسردگی و در عین حال پروجکشن نورونی مستقیم یا غیرمستقیم این دو هسته روی هم، در این پژوهش، نقش سیستم دوپامینرژیک D2 هسته آکومبیس و سیستم گلو تاماترژیک ناحیه پری لیمبیک بر رفتارهای شبه اضطرابی در موش های صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

در این تحقیق از موش‌های رت نر نژاد ویستار تهیه شده از پژوهشکده علوم شناختی، در محدوده وزنی ۲۸۰-۲۵۰ g استفاده شد. جانوران در گروه‌های ۸ تایی در قفس‌هایی به ابعاد (۱۵×۲۶×۴۲cm)، و در شرایط محیطی ثابت (C 22±2) و تنظیم نور با دوره‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح) نگهداری می‌شدند. تمامی آزمایشها بین ساعت ۱۰ تا ۱۳ صبح انجام شدند. این پژوهش مطابق با موازین جهانی حمایت از حیوانات انجام شد. بعد از تشخیص نر و ماده، نرها از جنس ماده جدا و در قفس‌های جدا در شرایط آزمایشگاهی کنترل شده نگهداری می‌شدند. علت انتخاب موش‌های نر، ساده‌تر بودن سیستم هورمونی و نیز تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها

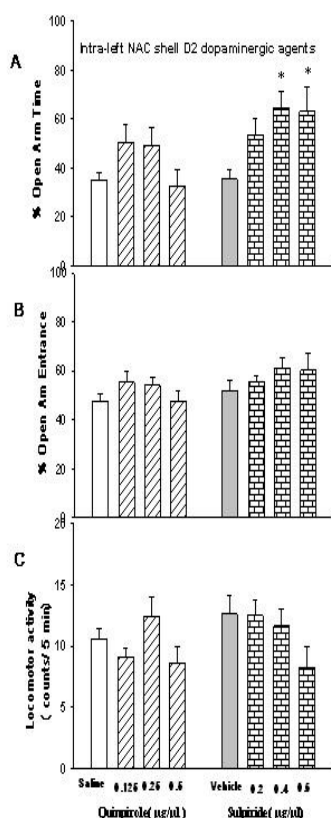
بود. وسایل مورد نیاز عبارت بودند از: دستگاه استریوتاکس مدل Kopf جهت توام مغز حیوان و کانول‌گذاری، دستگاه Elevated Plus Maze برای سنجش رفتارهای شبه اضطرابی، داروهای quinpirole (آگونیست گیرنده D2 دوپامینی)، سولیپیراید (آنتاگونیست گیرنده D2 دوپامینی)، NMDA (آگونیست گیرنده NMDA گلو تامات)، D-AP7 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده NMDA)، که بلافاصله قبل از آزمایش‌ها در سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ حل می‌شدند انتخاب نوع ماده آگونیست یا آنتاگونیست هر دارو بر پایه تحقیقات قبلی صورت می‌گرفت (۱)، (۷). داروهای تزریقی ذکر شده از شرکت (Tocris Cookson, Bristol, UK) خریداری شده بود. کتامین هیدروکلراید و زایلین جهت بیهوش کردن حیوانات مورد استفاده قرار گرفت. جانوران ابتدا به روش درون صفاقی با ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع بیهوشی (۵ ml) کتامین و ۲ ml زایلین) بر حسب کیلوگرم از وزن، بیهوش می‌شدند. سپس موش در دستگاه مخصوص جراحی (استریوتاکسی) قرار داده می‌شد. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات مغز رت، مشخصات پوسته آکومبیس طرف چپ {از نقطه برگما $AP = +1/4 \text{ mm}$ (قدامی-خلفی)، از خط وسط $ML + 0/7 \text{ mm}$ (میانی-جانبی)، از سطح جمجمه $5/5 \text{ mm} - DV =$ (شکمی - پشتی)} و پری لیمبیک طرف چپ از نقطه برگما $AP = +3/2 \text{ mm}$ (قدامی-خلفی) از خط وسط $ML = 0/7 \text{ mm}$ (میانی-جانبی)، از سطح جمجمه $2/5 \text{ mm} - DV =$ (شکمی - پشتی)} را بدست آورده و کانول‌های راهنما با ضخامت ۲۲ گیج در نقاط مورد نظر با دقت وارد می‌شد، طوری که درست در سطح بالایی ناحیه مد نظر قرار گیرد. اطراف کانول‌های روی استخوان جمجمه، ترکیب آکريل مخصوص دندانپزشکی و مونومر آن ریخته می‌شد، طوری که کانول‌ها در بالای ماده آکريل جهت تزریق قابل دسترس باشند. پنج تا هفت روز، دوره بهبودی پس از جراحی به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی لازم است. در روز اجرای آزمون، برای تزریق دارو از سر سوزن ۲۷ گیج دندانپزشکی (شرکت سوپا، ایران)، با طول ۲ میلی‌متر بلندتر از کانول‌های راهنما، که به لوله پلاستیکی متصل به سرنگ همیلتون ۲/۵ میکرولیتری بود استفاده می‌شد. تزریق ۰/۳ و ۰/۵ میکرولیتر دارو برای پوسته و ناحیه پری لیمبیک در هر کانول، و به مدت ۹۰-۶۰ ثانیه صورت می‌گرفت. الگوی حجم تزریق و مدت زمان آن، بر پایه تحقیقات قبلی و نیز گستردگی هسته‌های پری لیمبیک و پوسته آکومبیس بوده است (۷). به منظور آشنا شدن با محیط اتاق و کاهش استرس، حداقل نیم ساعت قبل از آزمون، موش‌ها در اتاق تست قرار می‌گرفتند. در طول تزریق، به حیوان اجازه داده می‌شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند. ۵ دقیقه بعد از تزریق دارو، موش‌ها در دستگاه Elevated Plus Maze مورد سنجش رفتارهای

سالمین در پری‌لیمبیک دریافت کردند. سه گروه آزمایشی اول، دوزهای مختلف NMDA دریافت کردند. سه گروه آزمایشی دیگر دوز بی‌اثر ۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر Sulpiride را درپوسته اکومینس چپ دریافت می‌کردند و بلافاصله در ناحیه پری‌لیمبیک چپ، سه دوز مختلف NMDA را دریافت می‌کردند. در انتهای آزمون و به منظور تایید محل تزریق داروها، ابتدا موشها توسط کلروفرم کشته شده، مغز جانور توسط دستگاه میکروتوم ویروسالایس در اندازه‌های ۴۰ میکرومتری برش داده می‌شد و تصاویر این برش‌ها با اطلس پاکسینوس و واتسون مقایسه می‌شد. مطالعات آماری: داده‌های به دست آمده در نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری می‌شد. به علت اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمالی بودند، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه اثرات دوزهای مختلف هر دارو با گروه کنترل مربوطه، و نیز از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه برای مقایسه بررسی اثرات برهم‌کنش بین داروها استفاده می‌شد. بعد از معنی‌دار بودن عدد F، با آنالیز Post Hoc Tukey. معنی‌دار بودن تفاوت گروه‌های آزمایشی بررسی می‌شد. $p < 0/05$ به عنوان تفاوت مقدار معنی‌دار گروه‌ها مورد ملاک قرار می‌گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار sigma plot صورت می‌گرفت.

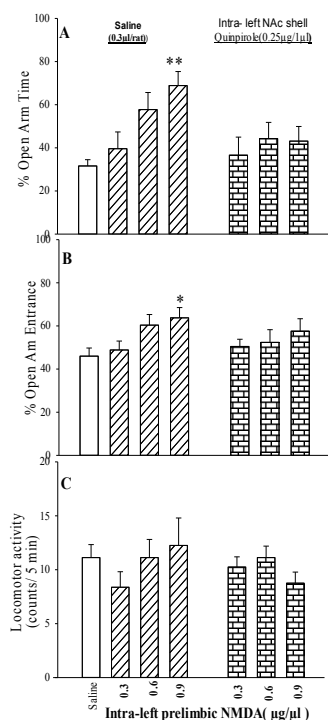
یافته‌ها

نمودار ۱: (نمودار ۱- سمت چپ) تزریق دوز ۰/۹ میکروگرم در میکرولیتر NMDA در ناحیه پری‌لیمبیک طرف چپ موجب افزایش معنی‌دار OAT% (نمودار A1- سمت چپ) ($P < 0/01$) و OAE% (نمودار B1- سمت چپ) ($P < 0/05$) جانوران نسبت به گروه کنترل شد. افزایش دوز NMDA به ۱/۲ میکروگرم در میکرولیتر باعث کاهش OAE% می‌شود. نتایج نشان داد که تزریق دوزهای بکار رفته D-AP7 در این ناحیه از موش صحرایی بر پارامترهای رفتار شبه اضطرابی اثری ندارد. تحلیل واریانس دو طرفه و post hoc Tukey نشان داد که تزریق دوز بی‌اثر ۰/۲۵ میکروگرم در میکرولیتر D-AP7 در پری‌لیمبیک طرف چپ موجب کاهش پاسخ NMDA روی OAT% (نمودار A1- سمت راست) ($P < 0/01$) و OAE% (نمودار B1- سمت راست) ($P < 0/05$) می‌شود. نتایج بیانگر اثر اضطراب‌زدایی NMDA در ناحیه پری‌لیمبیک و همچنین اثر آنتاگونیستی تزریق D-AP7 بر پاسخ اضطراب‌زدایی NMDA در این ناحیه است. تزریق دوزهای مختلف Quinpirole در پوسته اکومینس طرف چپ تغییری معنی‌دار در هیچ‌کدام از پارامترهای OAT%، OAE% و فعالیت حرکتی ایجاد نکرد. همچنین تزریق دوزهای ۰/۶ و ۰/۴ میکروگرم در میکرولیتر سولپیراید در پوسته اکومینس طرف چپ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده vehicle موجب افزایش OAT% شده $P < 0/05$ ، در صورتی‌که تغییری در پارامترهای OAE% و

شبه اضطرابی قرار می‌گرفتند. این مدل تست بر پایه کشمکش بین دو تمایل ذاتی حس جستجوگرانه و نیز احتراز از ارتفاع و ورود به محیط‌های باز و روشن در جانوران طراحی شده است (۷). مدت زمان سنجش رفتارهای جانور ۵ دقیقه بود. بر اساس بیشتر مطالعات و تحقیقات قبلی، آنچه که معیاری مناسب از رفتارهای شبه اضطرابی است و در نتایج آماری ذکر می‌شود عبارتند از: درصد تعداد ورود به بازوی باز OAE% (open arm entrance)، درصد زمان سپری شده در بازوی باز OAT% (open arm time)، که افزایش معنی‌دار در این دو پارامتر نشان‌دهنده کاهش رفتار شبه اضطرابی در حیوان می‌باشد و کاهش این پارامترها بیانگر افزایش رفتار شبه اضطرابی است. پارامتر مهم دیگری که مورد سنجش قرار می‌گرفت میزان حرکت جانور یا فعالیت حرکتی (Locomotor activity) بود، که بیانگر مجموع تعداد ورود به بازوی باز و بسته در زمان ۵ دقیقه است (۷). دوزهای دارویی مورد استفاده در این تحقیق، یا مشابه با دوزهای دارویی استفاده شده توسط محققین قبلی بدست آمده و یا بر اساس پاسخ دوزی (Dose response) داروها بوده است (۷ و ۸). گروه‌های آزمایشی ۸ تایی انتخاب شدند: آزمایش اول: یازده گروه موش مورد آزمایش قرار گرفتند و تمام تزریق‌های دارویی در ناحیه پری‌لیمبیک چپ صورت گرفت. گروه کنترل که ۰/۵ میکرولیتر سالمین دریافت کردند. چهار گروه آزمایشی اول، دوزهای مختلف NMDA (۰/۳، ۰/۶، ۰/۹ و ۱/۲ میکروگرم در میکرولیتر) دریافت کردند. سه گروه آزمایشی دوم دوزهای مختلف D-AP7 (۰/۵، ۰/۲۵ و ۱ میکروگرم در میکرولیتر) دریافت کردند. سه گروه آزمایشی دیگر دوز بی‌اثر ۰/۲۵ میکروگرم در میکرولیتر D-AP7 را قبل از تزریق دوزهای مختلف NMDA دریافت می‌کردند. آزمایش دوم: هشت گروه موش مورد آزمایش قرار گرفتند. تمام تزریق‌های دارویی در پوسته اکومینس چپ صورت گرفت. گروه اول از حیوانات سالمین ۰/۳ میکرولیتر دریافت کردند. سه گروه آزمایشی اول دوزهای مختلف Quinpirole (۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میکروگرم در میکرولیتر) دریافت کردند. گروه آزمایشی پنجم Vehicle ۰/۳ میکرولیتر دریافت کردند سه گروه آزمایشی دوم دوزهای مختلف Sulpiride (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میکروگرم در میکرولیتر) را دریافت کردند. آزمایش سوم: هشت گروه موش مورد آزمایش قرار گرفتند. گروه کنترل که ۰/۳ میکرولیتر سالمین در پوسته اکومینس و ۰/۵ میکرولیتر سالمین در پری‌لیمبیک دریافت کردند. سه گروه آزمایشی دوم دوزهای مختلف NMDA دریافت کردند. سه گروه آزمایشی دیگر، دوز بی‌اثر ۰/۲۵ میکروگرم در میکرولیتر Quinpirole در پوسته اکومینس چپ دریافت می‌کردند، و بلافاصله در ناحیه پری‌لیمبیک چپ، دوزهای مختلف NMDA را دریافت می‌کردند. آزمایش چهارم: ۸ گروه موش مورد آزمایش قرار گرفتند. گروه کنترل که ۰/۳ میکرولیتر سالمین در پوسته اکومینس و ۰/۵ میکرولیتر

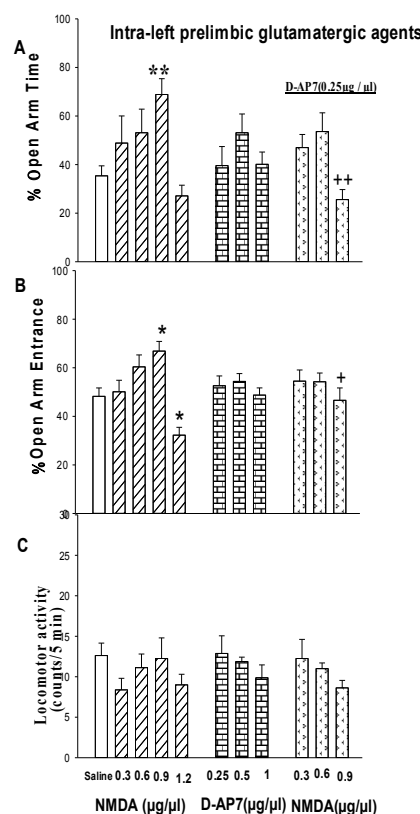


نمودار ۲: اثر تزریق Quinpirole و سولپیراید در پوسته اکومبسن طرف چپ بر رفتار شبه اضطرابی در موش بزرگ آزمایشگاهی. ($P < 0.05$) * در مقایسه با گروه دریافت کننده (vehicle)



نمودار ۳: اثر برهم کنش تزریق NMDA در ناحیه پری لیمبیک با Quinpirole در پوسته اکومبسن بر رفتار شبه اضطرابی در موش بزرگ آزمایشگاهی. ($P < 0.05$) *، ($P < 0.01$) ** در مقایسه با گروه سالین).

فعالیت حرکتی ایجاد نکرد (نمودار ۲). نتایج نشان داد که مهار گیرنده‌های D2 در این ناحیه مغزی از موش صحرایی موجب بروز رفتارهای شبه اضطراب زدا می‌شود. تزریق دوز بی اثر ۰/۲۵ میکروگرم در میکرولیتر Quinpirole در پوسته اکومبسن طرف چپ تغییری معنی‌دار بر پاسخ NMDA در ناحیه پری لیمبیک روی هیچکدام از پارامترهای OAT%، OAE% و فعالیت حرکتی ایجاد نکرد. نتایج نشان داد که تحریک گیرنده‌های D2 در پوسته اکومبسن اثری تعدیلی و یا تنظیمی بر رفتارهای اضطراب زدایی NMDA در ناحیه پری لیمبیک ندارد (نمودار ۳). تزریق دوز بی اثر ۰/۲ میکروگرم در میکرولیتر سولپیراید در پوسته اکومبسن طرف چپ موجب تقویت اثر دوز کم NMDA، ($P < 0.05$)، و در عوض باعث کاهش پاسخ دوز بالای آن روی OAT% (در ناحیه پری لیمبیک شد ($P < 0.01$))، همچنین باعث کاهش اثر دوز بالای NMDA روی OAE% ($P < 0.05$) می‌شود، برهم کنش ذکر شده اثری معنی‌دار روی فعالیت حرکتی ندارد. نتایج نشان‌دهنده اثر تعدیلی و وابسته به دوز مهار گیرنده‌های D2 دوپامینی در پوسته اکومبسن بر رفتار شبه اضطراب زدای ناشی از تحریک گیرنده‌های NMDA در پری لیمبیک است (نمودار ۴).



نمودار ۴: اثر تزریق D-AP7 و NMDA و برهم کنش آنها در ناحیه پری لیمبیک طرف چپ بر رفتار شبه اضطرابی در موش بزرگ آزمایشگاهی. ($P < 0.05$) *، ($P < 0.01$) ** در مقایسه با گروه سالین و $P < 0.05$ + و $P < 0.01$ ++ در مقایسه با گروههایی که فقط NMDA دریافت کردند).

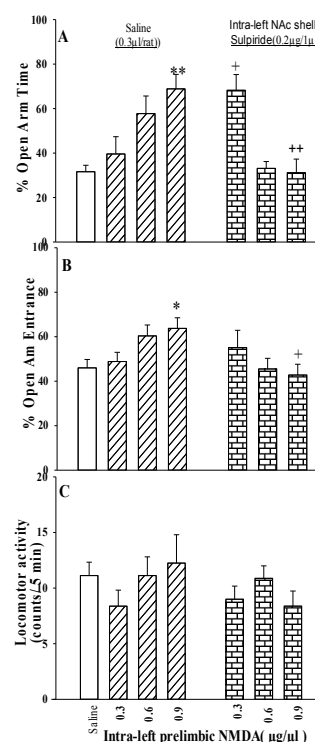
در ناحیه قاعده‌ای - جانبی آمیگدال دارای موجب کاهش رفتارهای شبه اضطرابی در مدل EPM در موش‌های صحرایی نمی‌شود (۱۱). به نظر می‌رسد مسیرهای دوپامینی تکمیتوم شکمی به هسته اکومبیس در ایجاد اثرات دوپامین بر روی اضطراب نقش داشته باشد (۱۲). داده‌های بدست آمده از این مطالعه نشان داد که اعمال دوزهای استفاده شده *quinpirole* در پوسته اکومبیس طرف چپ اثری بر رفتارهای شبه اضطرابی و پارامترهای مرتبط با آن ندارد. تحریک و مهارگیرنده D2 با استفاده از اعمال آگونیست و آنتاگونیست‌های آن در هسته هابنولای جانبی، بر خلاف گیرنده D1 موجب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی نمی‌شود (۱۳). نتایج داده‌های تحقیق حاضر از بررسی برهم‌کنش تزریق سولپیراید در پوسته اکومبیس طرف چپ با NMDA پری‌لیمبیک طرف چپ بر رفتارهای شبه اضطرابی موش‌های صحرایی نشان می‌دهد که تزریق دوز بی‌اثر سولپیراید در پوسته اکومبیس طرف چپ موجب تقویت اثر دوز پایین NMDA در پری‌لیمبیک طرف چپ برای بروز رفتارهای شبه اضطراب زد می‌شود. ممکن است غیرفعال سازی گیرنده D2 در پوسته اکومبیس موجب تقویت آزادسازی گلوتامات از پایانه‌های تحریکی نورون‌های گلوتاماتی شود که از ناحیه پری‌لیمبیک به این ناحیه آمده‌اند. این فرضیه توسط محققین قبلی هم مطرح شده است (۱۴). فعالیت گیرنده‌های NMDA در هسته اکومبیس با گیرنده‌های D1 برهم‌کنش هم‌افزایی و در عوض با گیرنده‌های D2 تداخل آنتاگونیستی دارند (۱۵). تفاوت اثر رفتاری مشاهده شده از برهم‌کنش دوز بی‌اثر سولپیراید در پوسته اکومبیس با دوزهای بیشتر و کمتر NMDA در ناحیه پری‌لیمبیک ممکن است مرتبط با میان‌کنش اثر وابسته به دوز این داروها در این دو ناحیه مغزی باشد. اعمال دوز بی‌اثر *quinpirole* در پوسته اکومبیس تغییری در پاسخ رفتارهای شبه اضطراب زدای القاء شده توسط NMDA در ناحیه پری‌لیمبیک ایجاد نکرد. تفسیر تفاوت اثر مشاهده شده در این تحقیق با نتایج تحقیقات قبلی ممکن است به علت اثرات دوگانه *quinpirole* روی پایانه‌های پس سیناپسی ایترونورون‌ها یا اثر آن بر گیرنده‌های D2 پیش‌سیناپسی پایانه‌های دوپامینی در پوسته اکومبیس باشد (۱۶)، که در مطالعه حاضر قادر به تغییر پاسخ NMDA نشده است.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که: ۱- فعال‌سازی گیرنده‌های NMDA در ناحیه پری‌لیمبیک رفتارهای شبه اضطراب‌زدا را القاء می‌کند. ۲- تزریق سولپیراید و *quinpirole* در پوسته اکومبیس، به ترتیب موجب کاهش و عدم تغییر در رفتارهای شبه اضطرابی می‌شود. ۳- تزریق دوز بی‌اثر سولپیراید در پوسته اکومبیس موجب تقویت اثر دوز پایین NMDA در پری‌لیمبیک شده، در صورتیکه پاسخ دوز بالای آن را مهار می‌کند.

قدردانی

از کلیه دوستان دانشجوی و همکاران پژوهشگاه علوم شناختی تهران که این پروژه با همکاری آنها صورت گرفته صمیمانه تشکر و



نمودار ۴: اثر برهم‌کنش تزریق NMDA در ناحیه پری‌لیمبیک با سولپیراید در پوسته اکومبیس بر رفتار شبه اضطرابی در موش بزرگ آزمایشگاهی. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) در مقایسه با گروه سالین و ++ $P < 0.01$ در مقایسه با گروه‌هایی که فقط NMDA دریافت کردند.

بحث

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق NMDA در طرف چپ این ناحیه موجب افزایش OAT/ و OAE/ می‌شود، که می‌توان آن را به عنوان کاهش رفتار شبه اضطرابی، و یا بروز رفتارهای شبه اضطراب زدای تفسیر کرد. نکته قابل توجه در این آزمایش این بود که افزایش بیشتر دوز NMDA در این ناحیه، موجب بروز رفتارهای اضطراب‌زایی شد. اثر اضطراب‌زایی NMDA در این آزمایش موافق با نتایج دیگر محققین نیز هست. تزریق NMDA به ناحیه آمیگدال در تست رفتاری EPM موجب افزایش رفتارهای اضطرابی شده است (۸). پژوهش حاضر نشان داد که دوزهای تزریق شده D-AP7 در ناحیه پری‌لیمبیک موش صحرایی بر پارامترهای مرتبط با رفتارهای شبه اضطرابی و نیز فعالیت حرکتی اثری نداشت، که ممکن است عدم اثر آن ناشی از تون گلوتاماتی پایین و یا کاهش تون فیزیولوژیکی گیرنده‌های NMDA در ناحیه پری‌لیمبیک باشد (۹). گزارش شده که تزریق آنتاگونیست‌های D-AP7, D-AP5 در برخی نواحی مغزی اثری روی رفتارهای شبه اضطرابی ندارد (۱۰). همچنین داده‌های بدست آمده در این مطالعه نشان داد که تزریق سولپیراید به پوسته اکومبیس طرف چپ موجب کاهش رفتارهای شبه اضطرابی می‌شود. به نظر می‌رسد مهار گیرنده‌های D2 دارای اثرات شبه اضطراب‌زدایی است. نتایج این آزمایش با گزارش‌های قبلی نیز همخوانی دارد. تزریق دو طرفه *raclopride* به عنوان آنتاگونیست D2

منافع متقابل

مؤلف اظهار می دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

ح-ا و همکاران پروین رستمی، محمد رضا زرین دست، محمد ناصحی طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته‌اند. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

منابع مالی

این پروژه پژوهشی با حمایت مالی کامل پژوهشکده علوم شناختی، آزمایشگاه علوم اعصاب و دانشگاه خوارزمی (ترتیب معلم) تهران اجرا شد.

References

- Zarrindast M R, Khakpai F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med* 2015; **18**(9): 591-603.
- Harvey B H, Shahid M. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: focus on pharmacology and preclinical translational models. *Pharmacology Biochem Behav* 2012; **100**(4): 775-800. doi: 10.1016/j.pbb.2011.06.014.
- Shirayama Y, Chaki S. Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Curr Neuropharmacol* 2006; **4**(4): 277-291. doi: 10.2174/157015906778520773
- Simon A B, Gorman J M. Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. *Neuro Rx* 2006; **3**(1): 57-68. doi: 10.1016/j.nurx.2005.12.005
- Groenewegen H J, Galis-de Graaf Y, Smeets W J. Integration and segregation of limbic cortico-striatal loops at the thalamic level: an experimental tracing study in rats. *J Chem Neuroanat* 1999; **16**(3): 167-185. doi: 10.1016/S0891-0618(99)00009-5
- Ding D C, Gabbott P L, Totterdell S. Differences in the laminar origin of projections from the medial prefrontal cortex to the nucleus accumbens shell and core regions in the rat. *Brain Res* 2001; **917**(1): 81-89. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02912-2
- Martinez G. Effects of selective NMDA and non-NMDA blockade in the nucleus accumbens on the plus-maze test. *Physiol Behav* 2002; **76**(2): 219-224. doi: 10.1016/S0031-9384(02)00704-7
- Zarrindast M R. Nicotine-induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus-maze: possible role of NMDA receptors of the central amygdala. *J Psychopharmacology* 2012; **26**(4): 555-563. doi: 10.1177/0269881111412094
- Harvey B H, Shahid M. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: focus on pharmacology and preclinical translational models. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; **100**(4): 775-800. doi: 10.1016/j.pbb.2011.06.014
- Menard J, Treit D. Intra-septal infusions of excitatory amino acid receptor antagonists have differential effects in two animal models of anxiety. *Behav Pharmacol* 2000; **11**(2): 99-10.
- Pavlova I, Rysakova V, Sergeeva M P. Receptor Blockade in Basolateral Amygdala on Behavior of Rats with High or Low Levels of Anxiety and Fear. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova s* 2015; **65**(4): 471-485. doi: 10.1007/s11055-016-0352-4
- Puglisi-Allegra S. Acute stress induces time-dependent responses in dopamine mesolimbic system. *Brain Res* 1991; **554**(1-2): 217-222. doi: 10.1016/0006-8993(91)90192-X
- Chan J, Ni Y, Zhang P. D1-like dopamine receptor dysfunction in the lateral habenula nucleus increased anxiety-like behavior in rat. *Neuroscience* 2017; **340**: 542-550. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.11.005
- Wang W. Regulation of prefrontal excitatory neurotransmission by dopamine in the nucleus accumbens core. *J Physiol* 2012; **590**(16): 3743-3769. doi: 10.1113/jphysiol.2012.235200
- David H N, Sissaoui K, Abiraini J H. Modulation of the locomotor responses induced by D1-like and D2-like dopamine receptor agonists and D-amphetamine by NMDA and non-NMDA glutamate receptor agonists and antagonists in the core of the rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 2004; **46**(2): 179-191. doi: 10.1016/j.neuropharm.2003.08.009
- Zhou F M, Hablitz J J. Dopamine modulation of membrane and synaptic properties of interneurons in rat cerebral cortex. *J Neurophysiology* 1999; **81**(3): 967-976.

Original Article

Study of cytotoxicity and cell death of an active compound from prazinoic acids in chronic myeloid leukemia K562 cell line

Halimeh Beignezhad¹, Mehdi Mohammadzadeh², Majid Mahdavi^{3*}, Hossein Mostafavi⁴

¹Msc Student of Biochemistry, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran

²Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran

³Department of Biology, School of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴Department of Organic Chemistry and Biochemistry, School of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: maj.mahdavi@gmail.com, majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

Received: 6 May 2017 Accepted: 24 July 2018 First Published online: 20 May 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):14-21

Abstract

Background: Nowadays, more than 100 types of cancer are known worldwide, which leukemia is one of the most common type. Chronic myeloid leukemia (CML) is one of the most recognized forms of leukemia, accounting for between 15% and 20% of total leukemia. Efforts to find new synthetic compounds are one of the basic strategies for finding new drugs for CML treatment. The purpose of this study was to investigate the effects of growth suppression and induction of apoptosis (family of pyrazinoic acid) on the cancer cell line of K562 leukemia.

Methods: In this study, the effect of a certain concentration of 2-oxo-1, 2-diphenylethyl-pirazine-2-carboxylate (2 DP.P) was evaluated on the growth, cell cycle and induction of apoptosis of K562 cells using various techniques. MTT test was used to investigate the effects of 2-DP.P on cell viability. For this purpose, 5×10^4 of K562 cells were cultured at concentrations of 25-100 μ M from the 2-DP.P for 24, 48 and 72 hours intervals. Electrophoresis, fluorescence microscopy and flow cytometry were used for analysis of apoptosis.

Results: The 2-DP.P inhibited dose and time dependently growth in K562 cells. IC₅₀ of the compound was calculated 25 μ M. Also, data from fluorescence microscopy, DNA fragmentation and cell cycle analysis confirmed the reduction of viability and induction of apoptosis by the compound.

Conclusion: due to the effects of growth inhibition and induction of apoptosis by the 2-DP.P, this compound can be suggested as a new and effective compound for further studies in treating patients with leukemia.

Keyword: Apoptosis, 2-DP.P, Cytotoxicity, K562 cell.

How to cite this article: Beignezhad H, Mohammadzadeh M, Mahdavi M, Mostafavi H. [Study of cytotoxicity and cell death of an active compound from propionic acids in chronic myeloid leukemia K562 cell line]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):14-21. Persian.

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ترکیب فعالی از خانواده ی پیرازینوئیک اسیدها بر سمیت و مرگ سلولی در رده ی سلولی لوسمی میلوئید مزمن K562

حلیمه بیگ نژاد^۱، مهدی محمد زاده^۲، مجید مهدوی^{۳*}، حسین مصطفوی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۴ گروه شیمی آلی و بیوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسوول: ایمیل: maj.mahdavi@gmail.com و majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۲۱-۱۴

چکیده

زمینه: امروزه بیش از ۱۰۰ نوع سرطان در دنیا شناخته شده است که از میان آن ها لوسمی یا سرطان خون یکی از شایع ترین سرطان ها است. لوسمی میلوئید مزمن (CML) از شناخته شده ترین اشکال لوسمی می باشد که ۱۵ تا ۲۰ درصد کل لوسمی ها را شامل می شود. امروزه تلاش ها برای یافتن ترکیبات سنتزی جدید یکی از استراتژی های پایه جهت یافتن داروهای جدید برای درمان CML است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ترکیبی از خانواده پیرازینوئیک اسیدها بر روی رده سلولی سرطانی لوسمی K562 می باشد.

روش کار: در بررسی حاضر، اثر غلظت معینی از ترکیب *2-DP.P* (2-*oxo-1,2-diphenylethyl pyrazine-2-carboxylate*) بر روی رشد، چرخه سلولی و القای آپوپتوز سلول های K562 با استفاده از تکنیک های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی اثرات ترکیب *2-DP.P* بر میزان زیستایی سلول، آزمون MTT به کار گرفته شد. بدین منظور تعداد 5×10^4 از سلول های K562 در غلظت های ۲۵-۱۰۰ میکرومولار از ترکیب *2-DP.P* در فواصل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. برای آنالیز آپوپتوز سلولی، الکتروفورز، میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه فلوسایتمتری استفاده شدند.

یافته ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب *2-DP.P* باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان در سلول های K562 میشود. *IC50* ترکیب ۲۵ میکرومولار محاسبه شد. همچنین، داده های حاصل از میکروسکوپ فلورسانس، آزمون قطعه قطعه شدن DNA و سیکل سلولی، کاهش زیستایی و مرگ سلولی از نوع آپوپتوز را توسط این ترکیب تایید کرد.

نتیجه گیری: به طور کلی با توجه به اثرات مهار رشد و القای آپوپتوز توسط ترکیب *2-DP.P* می توان این ترکیب را به عنوان ترکیبی جدید و موثر برای مطالعات بیشتر در درمان بیماران لوسمی پیشنهاد کرد.

کلیدواژه ها: آپوپتوز، 2-DP.P، سمیت، رده سلولی K562

نحوه استناد به این مقاله: بیگ نژاد ح، محمد زاده م، مهدوی م، مصطفوی ح. اثر ترکیب فعالی از خانواده ی پیرازینوئیک اسیدها بر سمیت و مرگ سلولی در رده ی سلولی لوسمی میلوئید مزمن K562. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۱(۲): ۲۱-۱۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

سرطان نام گروهی از بیماری‌های مرتبط به هم می‌باشد که در همه‌ی آن‌ها رشد بی‌رویه و گسترش غیرطبیعی سلول‌ها را داریم (۱و۲). امروزه بیش از صد نوع مختلف سرطان در دنیا شناخته شده است که لوسمی یا سرطان خون یکی از انواع مهلک و شایع آن‌ها می‌باشد (۳و۴). لوسمی میلوئیدی مزمن که ۱۵-۲۰ درصد از انواع لوسمی‌ها را شامل می‌شود، یک اختلال کلونال سلول‌های بنیادی خون ساز است که منجر به تظاهر کروموزوم فیلادلفیا (t 9:22) یا ژن bcr-abl در سلول‌های آسیب دیده می‌شود. این کروموزوم موجب ساخته شدن آنزیمی به نام تیروزین کیناز در مغز استخوان می‌شود که این آنزیم به نوبه خود موجب تبدیل تعداد بسیار زیادی سلول بنیادی به گلبول‌های سفید (گرانولوسیت‌ها یا بلاست‌ها) می‌شود. این پروتئین هیبریدی، آپوپتوز را مهار می‌کند و همچنین کلید فرمان تقسیم سلولی را همیشه در حالت «روشن» نگه می‌دارد و بدین ترتیب، تقسیم سلولی بطور غیرقابل‌کنترلی انجام می‌شود. افزایش تعداد گلبول‌های سفید و سلول‌های نابالغ مثل میلوئوسیت‌ها در خون محیطی از جمله تظاهرات بیماری است. تعداد پلاکت‌ها معمولاً افزایش یافته، امکان وجود بازوفیلی و بزرگی طحال نیز شایع می‌باشد (۵و۶). این بیماری به طور معمول افراد میانسال را درگیر می‌کند و ۱۵-۲۰٪ از لوسمی‌های بزرگسالان می‌باشد. میزان بروز آن تا اواسط دهه‌ی پنجم زندگی به کندی می‌باشد، ولی در بین ۴۰-۵۰ سالگی میزان بروز به سرعت افزایش می‌یابد. این بیماری شامل سه فاز مزمن، تسریع شده و بلاستیک می‌باشد. ۸۵٪ از بیماران در فاز مزمن تشخیص داده می‌شوند و بعد از ۳-۵ سال به سمت فاز تسریع شده و بحران بلاستیک پیشرفت می‌کنند. پس از مرحله بلاستیک بیماران بین ۳-۶ ماه زنده می‌مانند (۷).

تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است مانند درمان با شیمی درمانی، درمان با اینترفرون الفا و پیوند مغز استخوان. یکی از روش‌های درمانی استفاده از ترکیبات سنتتیک شیمیایی می‌باشد. با توجه به فاکتور مقاومت دارویی در رده‌های سرطان سلول‌های خونی، تلاش‌های گسترده‌ای برای یافتن داروهای شیمیایی خاص جهت مهار رشد و از بین بردن این سلول‌های بدخیم به کار رفته است. تاکنون پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در بسیاری از جنبه‌های تحقیقاتی به چشم می‌خورد. خصوصاً که افزایش یافته‌های ما در مورد دانش بیولوژی تومور، مکانیسم‌های عمل داروها را برای ما روشن‌تر کرده است. این موضوع همچنین پایه‌ای برای طراحی منطقی‌تر داروهای ضد سرطان بوده است (۸).

پیرازین‌ها ترکیبات نیتروژن دار آروماتیک هستند که توسط یک ساختار حلقه‌ای شامل چهار کربن با دو نیتروژن در موقعیت ۱ و ۴ مشخص می‌شوند (۹). مشتقات پیرازین دارای محدوده وسیعی

از فعالیت‌های بیولوژیک هستند. آن‌ها در ترکیبات متنوعی مانند آسپرژیلیک اسید، هیدروکسی آسپرژیلیک اسید و دیگر آنتی بیوتیک‌های دارای ساختار مشابه که دارای فعالیت‌های آنتی باکتریایی هستند یافت می‌شوند. سنتز مشتقات پیرازین تنوع وسیعی از ویژگی‌های دارویی را نشان می‌دهد (۱۰). پیرازینامید یک پیش دارو برای درمان سل هست که به نظر می‌رسد در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اثر آنزیم پیرازینامیداز به پیرازینوئیک اسید تبدیل شده و آنزیم سازنده‌ی اسید چرب را مهار می‌کند. از آنجا که اسیدهای چرب برای سنتز غشای سلولی مایکوباکتری‌ها ضروری هستند در نتیجه باعث مرگ باکتری می‌شوند (۱۱). طی یک سری از آزمایشات انجام گرفته نشان داده شد که ۵-2-alkyl-ferrocenyl-6, 7-dihydropyrazolo[1,5-a]pyrazine-4(5h)-one به طور موثری می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی A544 ریه القا کند (۱۲). همچنین مشتقاتی از 2-Imidazo[1,2-a]pyrazine از طریق مهار CAMP توسط یک فسفودی استراز می‌توانند تکثیر سلول‌های Dami را مهار کنند (۱۳). در مطالعاتی دیگر مشخص شده است که imidazo[1,2-a]pyrazine و مشتقاتش فعالیت‌های ضد تکثیری، تفکیکی و آپوپتوزی دارند. با توجه به این تحقیقات احتمالاً می‌توان از پیرازینوئیک اسیدها و مشتقات آن‌ها نیز برای تهیه‌ی داروهای ضد سرطان استفاده کرد (۱۴).

سلول‌های K562 جزء سلول‌های سرطانی خون با منشا میلوئیدی هستند که نخستین بار در یک خانم ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون شناسایی شدند. این رده‌ی سلولی به علت برخی ویژگی‌های خاص در مطالعات آزمایشگاهی بیشتر استفاده می‌شوند (۱۵و۱۶). در مطالعه‌ی حاضر از رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن (CML) استفاده شد. ترکیب مورد مطالعه 2-oxo-1,2-diphenylethyl pyrazine-2-carboxylate (2-DP.P) می‌باشد که جزئی از خانواده‌ی پیرازینوئیک اسیدها است و در آزمایشگاه تحقیقاتی دکتر حسین مصطفوی واقع در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز سنتز شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهار رشد و القای آپوپتوز این ترکیب بر روی رده‌ی سلولی K562 می‌باشد.

روش کار

برای تهیه غلظت‌های مختلف دارو از ترکیب 2-oxo-1,2-diphenylethyl pyrazine-2-carboxylate (2-DP.P) ابتدا با توجه به وزن مولکولی آن، از پودر آن برای غلظت ۱۰ میلی مولار وزن و سپس در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) (سیناژن، تهران) حل شد. سپس از این استوک غلیظ، و با توجه به روابط استوکیومتری مقدار حجم مشخصی از آن برداشته شد و برای

گردید. نمونه ها به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شده و در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در این مرحله سه فاز درون میکروتیوب ایجاد می گردد که فاز بالا محتوی DNA می باشد. فاز بالا به میکروتیوب دیگری منتقل شده و برابر با حجم آن ایزوپرانول سرد روی محلول ریخته شد و به آرامی سر و ته گردید، سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند تا DNA رسوب کند. سپس مایع رویی بیرون ریخته شد. در مرحله ی آخر به هر کدام از میکروتیوب ها پس از خشک شدن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. مقدار ۱۵ میکرولیتر از محلول موجود در میکروتیوب با ۵ میکرولیتر بافر لودینگ ۶x (۳۰٪ گلیسرول، ۲۵٪ بروموفنول بلو) در یک میکروتیوب دیگر مخلوط گردیده و روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. ژل با ولتاژ ۳۵ ولت به مدت ۲ الی ۳ ساعت الکتروفورز گردید، و در نهایت برای مشاهده ی نتیجه، ژل در دستگاه داک قرار داده شده و قطعات DNA با تابش نور UV نمایان گردید. در این مطالعه از ladder marker نیز استفاده گردید (۲۰).

در بررسی چرخه ی سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری نسبت سلول ها در هر مرحله از چرخه ی سلولی نشان داده می شود. بدین منظور سلول های تیمار شده در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و برای فیکس کردن سلول ها ۳ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ به سلول ها افزوده و به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شدند نمونه ها مجدداً در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده و با PBS شستشو داده شدند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از پروپیدیوم یدید (PI) به هر نمونه اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در جای تاریک قرار گرفت. در نهایت چرخه ی سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردید. این دستگاه با استفاده از نرم افزار خاص درصد جمعیت سلولی را در مراحل Sub G1، G1، S و G2/M مشخص می کند (۲۱).

تمامی داده های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 و میکروسافت اکسل ۲۰۱۰ و آزمون student t-test انجام شد و داده ها با ارزش $p < 0/05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

بررسی رشد و زیستایی ترکیب 2-DP.P در سلول های K562
جهت بررسی اثرات ترکیب فعالی از خانواده ی پیرازینوئیک اسید بر میزان مرگ سلولی، آزمون MTT به کار گرفته شد. اثرات مهاری ترکیب در چهار غلظت ۲۵، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رشد سلول ها بررسی شد (شکل ۱).

درست کردن محلول ۱ میلی مولار با محیط کامل رقیق شد. در ادامه مقدار مشخصی از دارو (بر اساس غلظت های مورد آزمایش) به هر کدام از چاهک ها اضافه شد (۱۷).

رده ی سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در محیط کشت RPMI-1640 (بیوسرا، انگلستان) غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) (بیوسرا، انگلستان) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین و پنی سیلین (سیناژن، تهران) ۱ درصد، در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد. سلول ها هر ۲۴ ساعت یک بار مورد پاساژ و تعویض مجدد محیط کشت قرار گرفتند (۱۷).

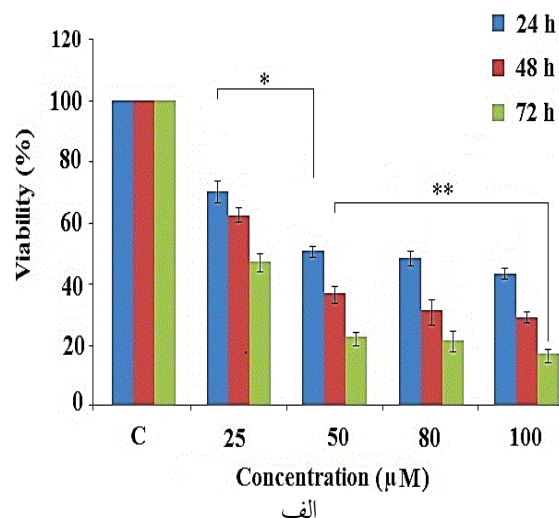
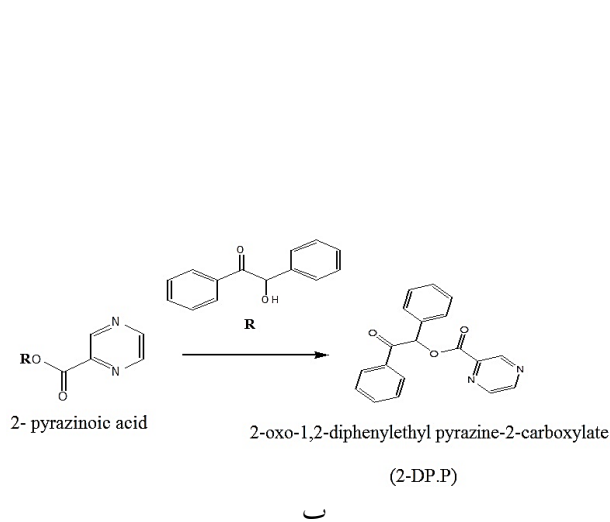
در بررسی رشد و زیستایی ترکیب 2-DP.P در سلول های K562 با استفاده از آزمون MTT این روش به منظور بررسی اثرات ضد توموری ترکیب، مقدار 5×10^4 سلول به همراه محیط کشت در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی ریخته شد. سپس غلظت های مختلف از ترکیب مورد نظر (۲۵، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به هر چاهک برای زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اضافه گردید. سپس به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه که رسوب حل شد، نور جذب شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. بر اساس جذب هر چاهک نسبت به چاهک کنترل، میزان زنده ماندن نمونه های تیمار به دست آمد (۱۸).

برای بررسی آپوپتوز از طریق رنگ آمیزی هوخست (Hoechst 33342) اثرات ترکیب بر ظاهر سلول های K562، به تعداد 5×10^4 سلول K562 در هر چاهک پلیت ۲۴ چاهکی کشت داده شد. و غلظت مشخص ۲۵ میکرومولار (بر اساس IC_{50}) از ترکیب مورد نظر به هر چاهک اضافه گردید. پس از گذشت ۷۲ ساعت سلول ها با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی دور ریخته شد. ۲ میکرولیتر رنگ هوخست ۳۳۳۴۲ به هر نمونه اضافه کرده و یک قطره از نمونه های به دست آمده روی لام قرار داده شد و تغییرات مورفولوژیک سلول های تیمار شده در قیاس با نمونه های کنترل توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

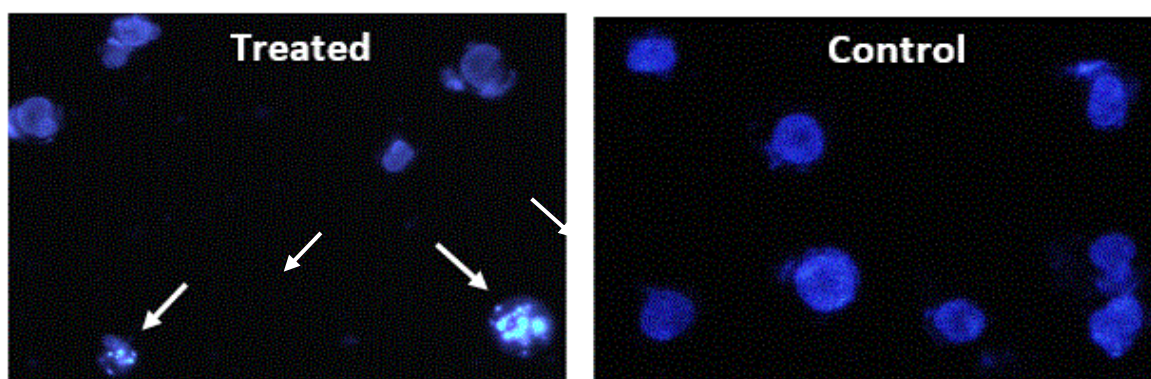
جهت بررسی قطعه قطعه شدن DNA به قطعات الیگو نوکلئوتیدی با اندازه ۱۸۰-۲۰۰ جفت بازی که طی آپوپتوز رخ می دهد از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. سلول های تیمار شده با ترکیب، تحت تاثیر ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده شامل (Tris, pH:8.0 0.820% [w/v] SDS, 100mM EDTA) قرار گرفته و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و سپس ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم و ایزوامیل الکل (با نسبت ۱:۱) به هر کدام اضافه

گردد) برای ترکیب برابر با ۲۵ میکرومولار، محاسبه شد. بررسی القاء آپوپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلوروسانس شکل ظاهری سلول های تیمار شده با ۲-DP.P بعد از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت IC50 محاسبه شده (۲۵ میکرومولار) توسط میکروسکوپ فلوروسانس مشاهده و عکس برداری شد. در رنگ آمیزی با رنگ هوخست سلول های طبیعی به صورت یکنواخت دیده می شوند در حالی که هسته ی سلول های آپوپتوز شده به واسطه ی متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیرمنظم و به صورت نقاط درخشان قابل مشاهده هست (شکل ۲).

یافته های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که ترکیب مورد نظر در مقایسه با گروه کنترل فعالیت سلول کشی وابسته به زمان و غلظت دارد (شکل ۱). به بیان دیگر با افزایش مدت زمان و غلظت دارو درصد مرگ سلول های سرطانی افزایش و نتیجه زنده ماندن سلول ها کاهش می یابد. ترکیب در ۲۴ ساعت کشندگی کمی داشته و بیشتر در این مدت زمان باعث تنش در سلول ها می گردد ولی با افزایش زمان در طی ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت های پایین تر دارویی باعث کشته شدن ۵۰ درصد از سلول ها می شود. میزان IC50 (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد ۵۰ درصدی سلول ها می



شکل ۱. الف) ساختار ترکیب 2-DP.P ب) بررسی اثر ترکیب 2-DP.P بر زیستایی سلول های K562 با استفاده از MTT در زمان ها (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و غلظت های مختلف (۲۵-۱۰۰ میکرومولار). ستون C مربوط به نمونه ی کنترل می باشد. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه تکرار مستقل $\pm$ انحراف استاندارد (SD) می باشد. [$p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*)]



شکل ۲. اثرات مورفولوژیک ترکیب 2-DP.P بر روی سلول های K562 بعد از ۷۲ ساعت تیمار با ۲۵ میکرومولار از ترکیب مورد مطالعه. سلول های تیمار نشده یا کنترل: سمت راست و سلول های تیمار شده با ترکیب 2-DP.P: سمت چپ (پیکان ها آپوپتوز را نشان می دهند).

مشاهده می شود DNA ژنومی سلول های K562 تیمار شده به صورت نردبانی بر روی ژل الکتروفورز دیده می شود در حالی که این حالت در سلول های کنترل مشاهده نمی گردد.

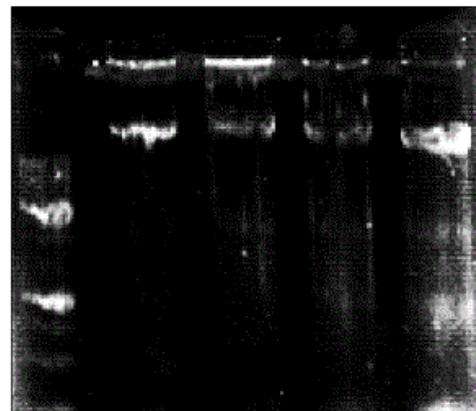
به منظور بررسی بیشتر آپوپتوز القاء شده توسط ترکیب، تغییرات مراحل چرخه ی سلولی بر اثر این دارو در سلول های K562 بررسی شد. این سلول ها پس از تیمار در غلظت ۲۵ میکرومولار با ترکیب 2-DP.P در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از رنگ PI بوسیله ی دستگاه فلو سایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود، در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول ها از ناحیه ی G0/G1 در حال کاهش و در ناحیه ی sub-G1 در حال افزایش است که دلالت بر ایجاد تغییرات در چرخه ی سلولی و القاء آپوپتوز توسط این ترکیب است.

بحث

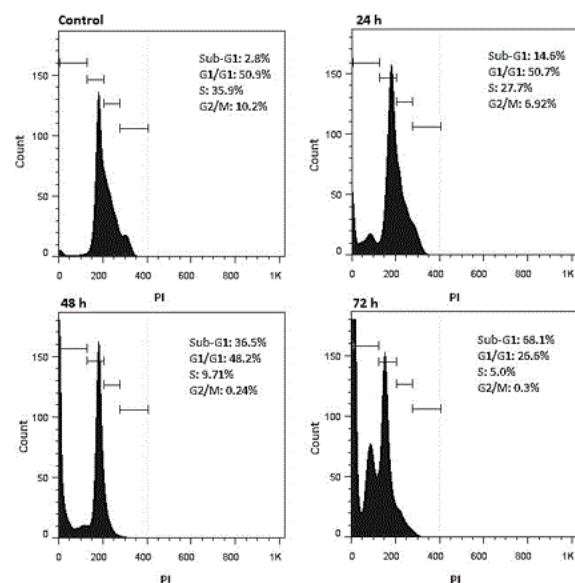
عدم تنظیم میزان تکثیر، تمایز و مرگ سلولی سبب اختلال در مرگ و افزایش بی رویه رشد سلولی می گردد. نقص در چرخه سلولی و همچنین نقص در مسیرهای آپوپتوزی و توانایی برای دوری جستن از مرگ سلولی از نشانه های سرطان است که منجر به رشد غیر کنترل شده سلول توموری می شود. اختلال در فرایند آپوپتوز عامل بسیار مهمی در ایجاد سرطان و گسترش آن به شمار می رود. سلول های سرطانی به علل مختلف نسبت به آپوپتوز مقاومت نشان می دهند. مقاومت به آپوپتوز از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول های سرطانی در برابر شیمی درمانی محسوب می شود از آنجایی که القای آپوپتوز روش مناسبی برای از بین بردن سلول های سرطانی است و اغلب سلول های سرطانی دارای نقص در مکانیسم های آپوپتوز خود می باشند، بنابراین هر عاملی که بتواند بر این مقاومت غلبه کند و باعث القای آپوپتوز در سلول های سرطانی شود می تواند به عنوان عاملی برای درمان سرطان مد نظر قرار گیرد (۲۲).

مطالعه ی حاضر به منظور بررسی اثرات ترکیب 2-DP.P که جزئی از خانواده ی پیرازینوئیک اسیدها می باشد، بر روی رده سلولی K562 از لوسمی میلوئید مزمن (CML) صورت گرفت. این رده ی سلولی به عنوان مدلی مناسب برای مرحله ی بلاست CML محسوب می شود. توسعه ی داروهای جدید برای درمان سرطان بر پایه توانایی این ترکیبات برای متوقف کردن تکثیر سلولی و القای آپوپتوز می باشد. از آنجا که ترکیبات سنتتیک پیرازینی دیگری که اخیراً مورد مطالعه قرار گرفتند، آپوپتوز را در سلول های سرطانی القا می کنند (که در مقدمه به آن ها اشاره شد)، در مطالعه حاضر نیز القای آپوپتوز توسط ترکیب جدیدی از خانواده پیرازینوئیک اسیدها (با نام اختصاری 2-DP.P) برای اولین بار بر روی رده ی سلولی K562 مورد مطالعه قرار گرفت. مشتقات

M C 24 h 48 h 72



شکل ۳. اثرات ترکیب 2-DP.P بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول های K562. سلول ها با ترکیب مورد نظر در غلظت ۲۵ میکرومولار به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و اثرات آپوپتوزی به وسیله ی قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید. M: ladder marker، C: نمونه ی کنترل



شکل ۴. داده های حاصل از فلو سایتومتری PI سلول های K562 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت ۲۵ میکرومولار توسط ترکیب مورد نظر (2-DP.P) تیمار شدند. داده ها حاکی از افزایش پیک sub-G1 (نشان دهنده وقوع آپوپتوز) پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت است.

به منظور اثبات بیشتر مرگ سلولی آپوپتوزی توسط ترکیب 2-DP.P از آزمون قطعه قطعه شدن DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. بر اساس نتایج نشان داده شده در شکل ۳، ترکیب مورد نظر باعث تغییر در الگوی ژنومی سلول های K562 تیمار شده در مقایسه با سلول های کنترل گردید. به طوری که

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده برای القای آپوپتوز در زمان های مختلف توسط ترکیب مورد مطالعه (2-DP.P) و اینکه این ترکیب در ۲۴ ساعت، کاهش کمی در زیستایی سلول های K562 ایجاد می کند ولی در زمان های بیشتر (۴۸ ساعت به بعد) زیستایی این سلول ها را به شدت کاهش می دهد، می توان گفت احتمالا این ترکیب ابتدا باعث القای تمایز در این سلول ها می شود و سپس این سلول ها را در مدت زمان بیشتری از تیمار به سمت مرگ آپوپتوزی می کشاند. بنابراین ترکیب 2-DP.P به صورت وابسته به غلظت و زمان باعث مهار رشد و القای آپوپتوز در رده ی سلولی K562 می شود. در نتیجه این ترکیب را می توان به عنوان ترکیبی جدید و موثر برای مطالعات بیشتر در درمان سرطان خون پیشنهاد نمود.

قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه و دانشگاه تبریز به جهت همکاری و حمایت های مالی آنها ابراز می دارند.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی شامل نمی شود.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرنت ۱۰۵/۴۸۵ از طرف دانشگاه ارومیه صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

مولفان اظهار می دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

ح ب، م م و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند.

پیرازین در فعالیت های مختلف فیزیولوژیکی مانند مانند فعالیت های ضد باکتریایی، ضد التهابی، فعالیت آرامش بخش رحمی، ضد انسداد، تحریک قلب، ضد افسردگی، فعالیت هیپوگلیسمی، فعالیت ضد انعقادی، کنترل واکشش های آلرژیک، فعالیت مهار کننده فسفودی استراز و فعالیت ضد توموری دخیل می باشند (۲۳).

برخی ترکیبات سنتتیک مشتق شده از پیرازین در مطالعه ی آزمایشی توسط Kamal و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی سرطان های لوسمی، ملانوم، ریه، کولون، CNS، تخمدان، کلیه، پروستات و سرطان های پستان آزمایش شده اند و فعالیت ضد توموری آنها مشخص شده است. تجزیه و تحلیل داده های این آزمایش نشان داد که این ترکیبات چرخه سلولی را در مرحله G0 / G1 در سلول های A549 متوقف می کنند و در نهایت منجر به مرگ سلول می شود. القای آپوپتوز نیز توسط Annexin، تجزیه DNA و رنگ آمیزی Hoechst تایید شد (۲۴).

در حال حاضر در آزمایشگاه ما (آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه تبریز) بر روی مشتقات دیگری از پیرازینوئیک اسیدها مطالعه می شود و فعالیت های ضد توموری آنها نیز در حال بررسی است. نتایج حاصل از آزمایش های حاضر نشان داد که ترکیب مذکور باعث کشته شدن سلول های K562 به صورت وابسته به غلظت و زمان می شود. به طوری که با گذشت زمان بیشتر و در غلظت های بالاتر، ترکیب مورد مطالعه دارای اثرات سیتوتوکسیک بیشتری می باشد (شکل ۱ ب). بررسی داده های ریخت شناسی سلول ها توسط میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که سلول های تیمار شده دچار تغییراتی از قبیل انقباض سلولی و تکه تکه شدن کروماتین شده اند که نشان دهنده ی وقوع آپوپتوز در این سلول ها می باشد. در حالی که سلول های کنترل هیچ آپوپتوزی را نشان ندادند. در تصاویر گرفته شده توسط این میکروسکوپ فلورسانس، سلول های کنترل شکل کروی و شفاف خود را حفظ کرده اند در حالی که سلول های تیمار شده تغییر شکل داده و نهایتا به سمت آپوپتوز سوق یافته اند (شکل ۲). برای اطمینان بیشتر از وقوع آپوپتوز، آزمون قطعه قطعه شدن DNA نیز انجام شد که نتایج حاصل از این آزمون نیز تایید کننده ی القای آپوپتوز توسط این ترکیب می باشد. همچنین آنالیز چرخه ی سلولی به منظور بررسی تاثیر ترکیب بر روی چرخه ی سلولی نشان داد که این ترکیب منجر به توقف چرخه سلولی در مرحله ی sub-G1 و القاء آپوپتوز می شود (شکل ۴).

References

- Ghasemian M, Mahdavi M, Rahnamay M, Zare P, HosseinpourFeizi M A, Balalaei S. Cytotoxic and Apoptotic Effects of the New Derivatives of Quinazoline Family on K562 Cells, Chronic Myelogenous Leukemia. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2014; 36(4): 86-93. (Persian).
- Rebecca L, Kimberly D, Ahmedin J. Cancer statistics 2016. *A cancer journal for clinicians* 2016; 66: 7-30. doi: 10.3322/caac.21332
- Bapiri A, Mohamadzadeh M. The Effect of Ibuprofen and Indomethacin on Human Chronic Myelocytic

- Leukemia K562 Cell Line: An In-Vitro Study. *J Esfahan Med Sch* 2015; **33**(328): 389-399. (Persian).
4. JoséFlores-Alvarez L, JuliaGuzmán-Rodríguez J, López-Gómez R, Salgado-Garciglia R, Ochoa-Zarzosa A, E.López-Meza J. PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2018; **99**: 10-18. doi: 10.1016/j.biocel.2018.03.013.
5. Kshama T, Sharique A, Kshitij T, Amrisha J, Sania Zahra R. Philadelphia Chromosome positive chronic myelogenous leukemia in childhood: a rare case report. *Era's Journal of Medical Research* 2017; **4**(1): 73-75. doi: 10.24041/ejmr2017.8
6. Hershkovitz-Rokah O, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A, Shomron N, Raanani P, et al. MiR-30e induces apoptosis and sensitizes K562 cells to imatinib treatment via regulation of the BCR-ABL protein. *Cancer Letters* 2015; **356**: 597-605. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.006
7. Cortez A P, Menezes E G, Benfica P L, Dos Santos L P, Cleres L M, H.O Ribeiro, et al. Grandisin induces apoptosis in leukemic K562 cells. *Braz J Pharm Sci* 2017; **53**(1): doi: 10.1590/s2175-97902017000115210
8. Barik S. Combination Therapy for Chronic Lymphoid Leukemia. *J Cancer Sci Ther* 2016; **8**: 4. doi: 10.4172/1948-5956.1000395
9. Zhang Y, Margaret Wade M, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; **52**: 790-795. doi: 10.1093/jac/dkg446
10. Foks H, Balewski L, Gobis K, Dabrowska-Szponar M, Wisniewska K. Studies on Pyrazine Derivatives. LII: Antibacterial and Antifungal Activity of Nitrogen Heterocyclic Compounds Obtained by Pyrazinamidrazone Usage. *Heteroatom Chemistry* 2012; **23**. doi: 10.1002/hc.20751
11. Osman F, Ismail F, Osman A, Omar A, Said H, Ismail N. High Resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. *JCM* 2016; **4**: 155-172. doi: 10.1128/JCM.00396-10
12. Pan X H, Liu X, Zhao B X, Xie Y S, Shin D S, Zhang S L, et al. 5-Alkyl-2-ferrocenyl-6,7-dihydropyrazolo [1,5-a] pyrazin-4(5H)-one derivatives inhibit growth of lung cancer A549 cell by inducing apoptosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; **16**: 9093-9100. doi: 10.1016/j.bmc.2008.09.046
13. Zurbonsen K, Michel A, Vittet D, Bonnet P A, Chevillard C. Antiproliferative effects of imidazole[1,2-β] pyrazine derivatives on the dami cell line. *Biochemical Pharmacology* 1997; **54**: 365-371. doi: 10.1016/S0006-2952(97)00224-4
14. Zurbonsen K, Michel A, Bonnet P A, Mathieu M N, Chevillard C. Antiproliferative, Differentiating and Apoptotic Effects Elicited by Imidazo[1,2-a] pyrazine Derivatives. *Gen Pharmac* 1999; **32**: 135-141. doi: 10.1016/S0306-3623(98)00097-4
15. Deininger M W, Goldman J M, Melo J V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; **96**(10): 3343-3356.
16. Bosch G J, Joosten A M, Kessler J H, Melief C J, Leeksa O C. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 1996; **88**(9): 3522-3527.
17. Alemi Serej F, Mahdavi M, Zare P, Hosseini Pour Feizi M A, Balalaei S. Biological Evaluation of Aminopyrimidines Derivatives as Growth Inhibitor and Apoptosis Inducer of K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; **24**(116): 1-10. (Persian).
18. Bijnsdorp I V, Giovannetti E, Peters G J. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol* 2011; **731**: 421-434.
19. Mahdavi M, Yazdanparast R. Ginidilatimonein from *Dephne mucronata* induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Arch Pharm Res* 2007; **30**(2): 177-181. doi: 10.1007/bf02977692
20. Philchenkov A, Miura K. The IAP Protein Family, SMAC Mimetics and Cancer Treatment. *Cri. Rev Oncog* 2016; **21**(3-4): 185-202. doi: 10.1615/Crit RevOncog.2016017032
21. Rahimi R, Mahdavi M, Pejman S, Zare P, Balalaei S. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by the derivative (3-NpC) from dihydro-pyranochromenes family. *Acta Biochim Pol* 2015; **62**: 83-85. doi: 10.18388/abp.2014_825
22. Ferreira C G, Epping M, Krut F A, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 2024-2034.
23. Myadaraboina S, Alla M, Saddanapu V, Rao Bommena V, Addlagatta A. Structure activity relationship studies of imidazo [1,2-a] pyrazine derivatives against cancer cell lines. *Eur J Med Chem* 2010; **45**: 5208-5216. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.08.035
24. Kamal A, Ramakrishna G, Raju P, Subba Rao A V, Viswanath A, Lakshma Nayak V, et al. Synthesis and anticancer activity of oxindole derived imidazo[1,5-a] pyrazines. *Eur J Med Chem* 2011; **46**: 2427-2435. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.03.027.

Original Article

The Expression Changes of the *Mcl-1* Gene Following Cholestasis and Treatment by Neuroaid in Striatum of Male Rats

Sepehr Torabinejad¹, Mehrdad Hashemi^{2*}, Mohammad Nasehi²

¹MSC Student in Genetics, Department of Genetics, Faculty of Advanced Sciences, and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Genetics, Faculty of Advanced Sciences, and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: mhashemi@iautmu.ac.ir

Received: 16 January 2017 Accepted: 9 March 2017 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):22-29

Abstract

Background: Cholestasis is a consequence of disordered bile secretion which may change the level of apoptosis through affecting the expression of responsible genes. The present study was planned to investigate the effects of Cholestasis and Neuroaid (a drug which protects and repairs neurons) on the expression of *Mcl-1* gene (anti apoptotic gene) in the male rat's brain (the striatum region).

Methods: A total number of 16 rats were divided into four groups as follows: 1- BDL group; the rats which were just operated for bile duct ligation. 2- BDL-Neuroaid group; the rats which received both operation and Neuroaid. 3- Sham-Neuroaid group; the rats which were not operated, but received the operation stress and Neuroaid. 4- Control group; the rats which were not treated at all. Following the treatments, the rats were killed and their striatums were removed from their brains. Afterwards, RNA was extracted from the striatum cells, cDNA was synthesized, and the Real time PCR was performed to measure the gene expression.

Results: The *Mcl-1* expression in the BDL group was more than in the control group. It was also four times as much as the *Mcl-1* expression in the BDL-Neuroaid group. The *Mcl-1* expression in the BDL-Neuroaid and Sham-Neuroaid groups was slightly more than in the control group; however, the difference was not statistically significant.

Conclusion: Cholestasis causes a large increase in the expression of *Mcl-1* gene in the striatums of rats' brain. Neuroaid can invert this process and decrease the *Mcl-1* expression whilst it has no effects on the *Mcl-1* expression in normal rats.

Keyword: Apoptosis, Cholestasis, *Mcl-1* Gene Expression Changes, Neuroaid, Striatum.

How to cite this article: Torabinejad S, Hashemi M, Nasehi M. [The Expression Changes of the *Mcl-1* Gene Following Cholestasis and Treatment by Neuroaid in Striatum of Male Rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):22-29. Persian.

مقاله پژوهشی

تغییرات بیان ژن *Mcl-1* متعاقب کلستاز و تیمار با نورواید در استریاتوم رت‌های نرسپهر ترابی نژاد^۱ ID، مهرداد هاشمی^{۲*} ID، محمد ناصحی^۲ ID^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین پزشکی واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فن آوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: ایمیل mhashemi@iautmu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۲۲-۲۹

چکیده

زمینه: کلستاز، نتیجه اختلال در روند ترشح صفرا است که می‌تواند بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز تأثیرگذار باشد. این پژوهش به بررسی اثرات کلستاز و داروی نورواید بر تغییرات بیان ژن آنتی آپوپتوتیک *Mcl-1* در ناحیه استریاتوم مغز رت‌های نر پرداخته‌است.

روش کار: تعداد ۱۶ سر رت به ۴ گروه BDL، BDL-نورواید، شم-نورواید و کنترل تقسیم شدند. رت‌های گروه BDL تحت جراحی BDL (بستن مجرای صفراوی)، و گروه BDL-نورواید علاوه بر جراحی تحت تیمار با نورواید قرار گرفتند؛ در حالی که حیوانات گروه شم-نورواید فقط استرس جراحی دریافت کرده و با دارو تیمار شدند و گروه کنترل هیچ‌گونه جراحی و تیمار دارویی نداشتند. سپس استریاتوم از مغز رت‌ها خارج شد و پس از طی مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA، سنجش بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان ژن *Mcl-1* در گروه BDL نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. مقایسه گروه‌های BDL و BDL-نورواید نیز نشان داد که بیان این ژن در گروه BDL چهار برابر گروه BDL-نورواید بوده است. ولی بیان این ژن در گروه‌های BDL-نورواید و شم-نورواید نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، هر چند مقدار آن در این گروه‌ها اندکی بیش از گروه کنترل بود.

نتیجه‌گیری: کلستاز مصنوعی (BDL) باعث افزایش بیان ژن *Mcl-1* در استریاتوم مغز رت‌ها می‌شود. داروی نورواید می‌تواند افزایش بیان ژن *Mcl-1* ناشی از کلستاز را جبران کرده و بیان آن را به حالت عادی بازگرداند، اما تأثیری بر بیان این ژن در رت‌های نرمال نمی‌گذارد.

کلید واژه‌ها: آپوپتوز، استریاتوم، تغییرات بیان ژن *Mcl-1* کلستاز، نورواید.

نحوه استناد به این مقاله: ترابی نژاد س، هاشمی م، ناصحی م. تغییرات بیان ژن *Mcl-1* متعاقب کلستاز و تیمار با نورواید در استریاتوم رت‌های نر. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۲۲-۲۹

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

تولید و ترشح صفرا یکی از وظایف کبد پستانداران است که گاهی دچار اختلال شده و در نتیجه منجر به وقوع بیماری‌های کبدی می‌شود (۱). انسداد مجرای صفراوی (BDL-Bile Duct Ligation) در حیوانات، مدلی تیپیک برای مطالعه بیماری‌های صفراوی است. BDL منجر به بسته شدن کامل مجرای صفراوی شده و نتیجه آن بروز بیماری کبد کلستاتیک می‌باشد (۲). کلستاز نتیجه اختلال در ترشح صفرا است که باعث نگهداری ترکیبات سمی صفراوی در داخل سلول‌ها شده و در صورت عدم درمان، سبب ایجاد فیروز، سیروز و نارسایی کبدی و در نهایت نیاز به پیوند کبدی می‌شود (۱). کلستاز را می‌توان به دو دسته درون کبدی و برون کبدی تقسیم کرد. کلستاز درون کبدی به طور اولیه شامل درگیری مجاری درون کبدی و کانالیکولی صفراوی است، در حالی که کلستاز برون کبدی شامل درگیری مجاری خارجی، مجرای کبدی مشترک و یا مجرای صفراوی مشترک می‌باشد (۳). یکی از تبعات مستقیم آسیب‌های ناشی از تجمع اسیدهای صفراوی، آپوپتوز است که باعث آسیب دیدن کبد مبتلایان به کلستاز می‌شود (۴). آپوپتوز معمول‌ترین نوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بوده و بیشترین مطالعات بر روی آن انجام گرفته است. دو مسیر اصلی برای القای آپوپتوز وجود دارد. یکی مسیر خارجی و دیگری مسیر داخلی. مسیر خارجی توسط برهم‌کنش مولکول‌های سیگنالینگ پروآپوپتوتیک با گیرنده‌های سطحی، سبب القای آپوپتوز می‌شود. در گام بعد، فعال شدن آبشار کاسپازی سیتوزولی موجب پیشبرد آپوپتوز می‌گردد. در مسیر داخلی، آبشار کاسپازی درون سیتوزول فعال می‌شود. در این مسیر پروتئین‌هایی از اندامک‌های گوناگون مانند میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی و جسم‌گلژی آزاد شده و یا این که آپوپتوز توسط بیان ژن‌هایی که پروتئین‌های پروآپوپتوتیک را بیان می‌کنند القا می‌شود (۵). مسیر داخلی آپوپتوز به وسیله اجزای پروتئینی خانواده *Bcl2* تنظیم می‌گردد. این خانواده شامل پروتئین‌های موافق یا مخالف آپوپتوز (پروآپوپتوتیک یا آنتی‌آپوپتوتیک) می‌باشد (۸-۶). یکی از داروهای ضد آپوپتوز نورواید است (۱۰-۹) که در طب سنتی، در مناطقی نظیر چین، جنوب شرق آسیا و خاورمیانه مورد استفاده قرار گرفته است. تحقیقات Heurteaux و Quintard و همکاران نشان داد که این دارو بر بیمارانی که دچار سکتة مغزی شده‌اند اثرات مفیدی می‌گذارد؛ به خصوص اینکه عوارض پس از سکتة را کاهش می‌دهد. دلیل این اثر، خاصیت محافظت و تکثیر کنندگی نورونی نورواید می‌باشد (۱۱-۱۲). این دارو دارای دو نوع MLC901 و MLC601 می‌باشد (۱۱). MLC601 مرکب از ۹ ترکیب گیاهی و ۵ ترکیب جانوری است؛ در حالی که MLC901 تنها از ترکیبات گیاهی تهیه شده است (۹). با توجه به تاثیر کلستاز و نورواید بر فرایند آپوپتوز، در این پژوهش اثر کلستاز مصنوعی (BDL) و

نورواید (نوع MLC901) بر بیان یک ژن شرکت‌کننده در آپوپتوز (ژن *Mcl-1*) در ناحیه استریاتوم مغز رت‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. *Mcl-1* یک ژن آنتی‌آپوپتوتیک است که از طریق جلوگیری از بیان عوامل پروآپوپتوتیک، در جهت جلوگیری از وقوع آپوپتوز فعالیت می‌کند (۱۳).

روش کار

در این مطالعه از تعداد ۱۶ سر رت نر نژاد ویستار به وزن ۲۲۰ تا ۲۴۰ گرم که از دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران تهیه شد، استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی منتقل شده و در هر قفس چهار سر رت قرار داده شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار رت‌ها قرار گرفت و هر سه روز یک بار قفس آن‌ها تمیز شد. دما در حیوان‌خانه بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. به مدت یک هفته به رت‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه قبل از جراحی وفق بدهند. در طول یک هفته هر روز حیوان‌ها نوازش شدند تا در موقع آزمایش استرس ناشی از گرفتن و کار با آن‌ها وجود نداشته باشد. هر حیوان فقط یک بار استفاده شده و در هر گروه چهار حیوان قرار داده شد. تمام آزمایش‌ها در طول روز انجام شدند. تمامی مراحل آزمایش و کار با حیوانات بر اساس تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران انجام شده است. رت‌ها به چهار گروه تقسیم شدند که شامل گروه‌های BDL-نورواید، BDL-شم-نورواید و کنترل می‌باشند. الف) گروه BDL-نورواید: در رت‌های این گروه انسداد مجرای صفراوی ایجاد شده و متحمل دریافت داروی نورواید نیز شدند. ب) گروه BDL: در تمام رت‌های این گروه انسداد مجرای صفراوی ایجاد شد اما هیچ کدام از حیوان‌ها در این گروه دارویی را دریافت نکردند. ج) گروه شم-نورواید: این رت‌ها علاوه بر آن که در معرض استرس جراحی (باز و بسته شدن شکم، بدون مسدود کردن مجرای صفراوی) قرار گرفتند، داروی نورواید را هم دریافت کردند. بنابراین با قرار دادن این گروه، تاثیر استرس ناشی از جراحی به همراه دریافت نورواید مورد بررسی قرار گرفت. د) گروه کنترل: رت‌های این گروه تنها دارای رژیم آب و غذا بوده و هیچ‌گونه تیمار دارویی یا جراحی نداشتند. حیوان‌ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید ۱۰٪ (۵۰ mg/kg) و زایلزین ۲٪ (۵۰ mg/kg) بیهوش شده، بعد از بیهوشی سطح شکمی حیوان شکافته و با استفاده از نخ بخیه استریل غیرجذبی، دو گرہ در دو نقطه از مجرای صفراوی مشترک زده شد. حد فاصل بین این دو گرہ با استفاده از قیچی برش زده شد تا از صحت قطع جریان صفراوی اطمینان حاصل شود. جهت بازگرداندن حیوان به حالت همئوستاتیک و جبران خون از دست رفته و استرس وارده، به مقدار ۱۰۰ واحد انسولین، سرم فیزیولوژی

به صورت داخل صفاقی به حیوان تزریق گردید. در ادامه هر کدام از حیوان‌ها به صورت جداگانه در قفس‌های پلاستیکی قرار داده شدند تا به سطح هوشیاری کامل برسند. پس از رسیدن رت‌ها به این سطح از هوشیاری، آن‌ها درون قفس‌های اصلی که هر کدام مخصوص نگهداری چهار سر حیوان بود، قرار داده شدند (۱۴). نورواید با دوز 0.4 mg/ml (۱۰)، و به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به میزان 1 ml به صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد. تمامی تزریق‌ها از روز بعد از جراحی آغاز و به صورت یک روز در میان تا روز ۲۸ پس از جراحی (۱۴ تزریق) ادامه یافت. یک روز پس از آخرین تزریق رت‌ها با استفاده از کلروفرم بیهوش شده و سر آن‌ها با دستگاه گیوتین جدا گردید. سپس به وسیله قیچی، برش طولی از پوست سر رت داده شد. در ادامه مجسمه از شکاف نخاعی برش خورده و کنار زده شد تا کل مغز استخراج گردد. برای جدا کردن ناحیه استریاتوم، برشی در شیار اول از سمت لوب پیشانی زده شد. سپس برش دیگری از سمت شیار دوم داده شد. بعد از این برش، قشر خارجی مغز، بخش‌های میلین دار و هسته اکومینس با تیغ جراحی جدا شدند تا ناحیه استریاتوم به دست آید. RNA تام توسط ترايزول (Qiagen, Germany) از بافت استریاتوم رت‌ها به روش زیر استخراج گردید. ابتدا 5 mg بافت هموزانیز شده در 1 ml ترايزول حل شد. سپس $200 \mu\text{l}$ کلروفرم به آن اضافه شده و سانتریفیوژ انجام گرفت (با دور 12000 RPM به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای 4°C). فاز آبی حاصل از سانتریفیوژ جدا شده و معادل حجمش به آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای -20°C انکوبه و مجدداً با شرایط فوق سانتریفیوژ گردید. رسوب بدست آمده که شامل RNA تام بود، سه مرتبه توسط اتانول 70% سرد شستشو داده شد. برای هر مرحله شستشو، سانتریفیوژ در دمای 4°C و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 11000 RPM انجام شده و محلول رویی دور ریخته شد. به این ترتیب ایزوپروپانول از رسوب RNA حذف گردید. سپس چگالی نوری ($A_{260/230}$ و $A_{260/280}$) و غلظت RNA های استخراج شده توسط دستگاه نانوفومتر (BioTeck, USA) اندازه‌گیری شد. از RNA های استخراج شده جهت ستر تک رشته cDNA بهره گرفته شد. برای این کار از کیت ستر cDNA (SinaClon, Iran) استفاده گردید. مقدار RNA ورودی به کیت 1500 ng و غلظت cDNA ساخته شده برابر با $75 \text{ ng}/\mu\text{l}$ بود. جهت ساخت Master ستر cDNA از $100 \mu\text{M}$ Oligo d(T)₁₈، $1 \mu\text{l}$ $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، $10 \mu\text{l}$ 2 Buffer M-MuLV، $2 \mu\text{l}$ 10 mM dNTP Mix، $200 \text{ u}/\mu\text{l}$ M-MuLV Reverse Transcriptase، $0.5 \mu\text{l}$ $40 \text{ u}/\mu\text{l}$ (Rnase Inhibitor) و آب تیمار شده با DEPC ($5 \mu\text{l}$) استفاده شد. سپس Master حاصل شده به $9 \mu\text{l}$ RNA اضافه شد و داخل ترموسایکلر در دمای 42°C به مدت یک ساعت و دمای 85°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا cDNA

داده‌ها به صورت میانگین نسبت بیان ژن در گروه تیمار به گروه کنترل + خطای انحراف از معیار (Mean+SEM) بیان شدند.

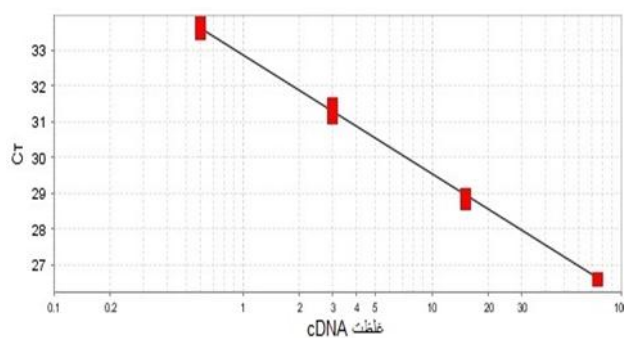
یافته‌ها

شیب خط منحنی استاندارد برای ژن‌های رفرنس و هدف به ترتیب برابر با $-3/339$ و $-3/329$ بود (شکل ۱). بنابراین بازده PCR برای ژن‌های مذکور $0/99 = E_{Gapdh}$ و $0/99 = E_{Mcl-1}$ محاسبه شد. (شکل ۲) منحنی‌های ذوب ژن‌های *Gapdh* و *Mcl-1* را نشان می‌دهد. تک قله‌ای بودن هر دو منحنی، بیانگر تکثیر اختصاصی

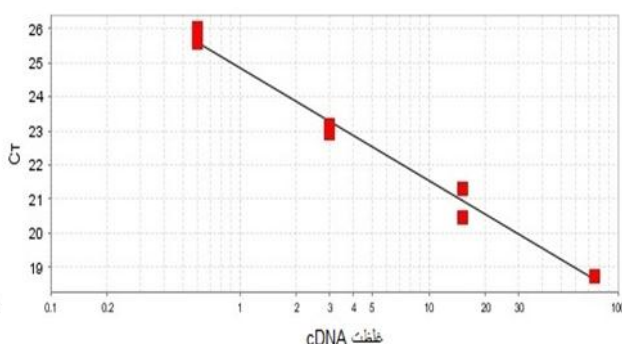
جدول ۱: پرایمرهای ژن‌های مورد نظر

نام ژن	سکانس پرایمر ۵'→۳'	طول قطعه تکثیر شونده	طول پرایمر	دمای ذوب پرایمر
<i>Gapdh</i>	F: AAGTTCAACGGCAGTCAAGG R: CATACTCAGCACCAGCATCACC	۱۲۱	F۲۲ R۲۲	F۶۱/۵۸ R۶۱/۳۲
<i>Mcl-1</i>	F: CGTAACAACTGGGGCAGG R: GAAGAACTCCACAAACCCATCC	۱۸۷	F۱۹ R۲۲	F۵۸/۷۵ R۵۹/۱۸

* پرایمر Forward † پرایمر Revers

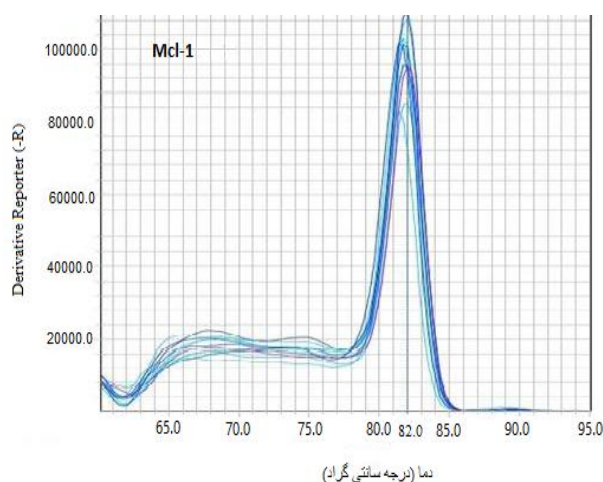


ب

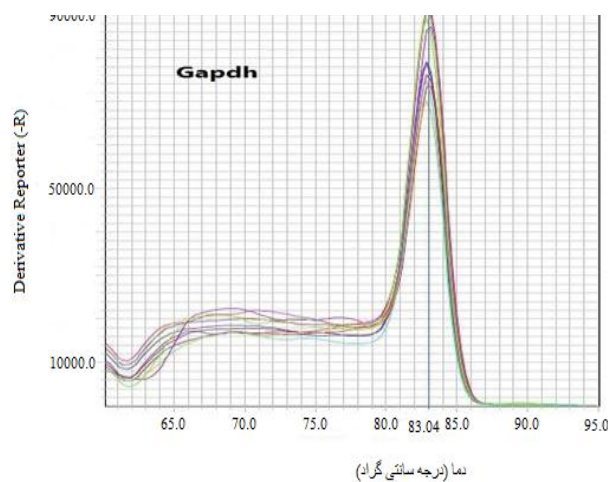


الف

شکل ۱: منحنی‌های استاندارد تکثیر الف) ژن *Gapdh*. شیب خط: $-3/339$ بازده: $0/99$ ب) ژن *Mcl-1*. شیب خط: $-3/329$ بازده: ۱

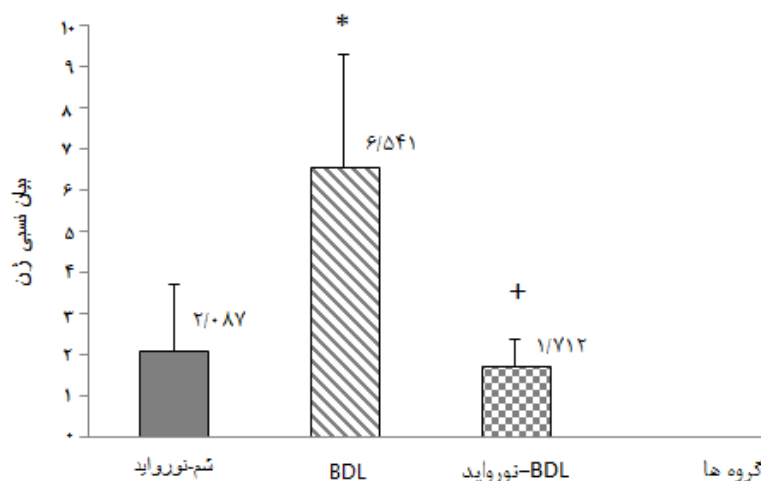


ب



الف

شکل ۲: منحنی‌های ذوب قطعات تکثیر شده الف) ژن *Gapdh* با نقطه ذوب $83/04^{\circ}\text{C}$ ب) ژن *Mcl-1* با نقطه ذوب 82°C



شکل ۳: نمودار بیان نسبی ژن *Mcl-1* در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل (* نشانگر معنی‌داری با گروه کنترل و + نشان‌دهنده معنی‌داری با گروه BDL). هر گروه شامل چهار سر رت بوده و واکنش Real time PCR به صورت دوبار تکرار انجام شده است.

بحث

حدی کاهش می‌دهد که به میزان نرمال برساند. این در حالی است که نورواید هیچ تاثیری بر بیان این ژن در رت‌های سالم ندارد. این نتایج تنها مربوط به ناحیه استریاتوم مغز رت است و قابل تعمیم به سایر بافت‌ها نمی‌باشد. مطالعات بسیاری به تاثیر عواقب کلستاز (مانند تجمع نیتریک اکساید (۲۷) و اپیوئیدها (۱۹)) بر بیان ژن‌های پروآپتوتیک یا آنتی آپتوتیک پرداخته‌اند. به عنوان مثال Chae و همکاران با مطالعه روی اثر نیتریک اکساید بر بیان ژن‌های *Bax* (پروآپتوتیک) و *Bcl2* (آنتی آپتوتیک) در سلول‌های ماهیچه‌ای صاف رت‌ها دریافتند که نسبت *Bax/Bcl2* در این سلول‌ها افزایش یافته است (۲۸). Hayashi و همکاران در پژوهشی تاثیر افزایش بلند مدت اپیوئیدها را بر آپوپتوز نورون‌ها مورد بررسی قرار دادند. این بررسی حاکی از افزایش پروتئین *Bax* و کاهش پروتئین *Bcl2* بود (۲۹). در رابطه با تاثیر داروی نورواید نیز می‌توان به مطالعه تحقیقاتی Quintard و همکاران و همچنین Heurteaux و همکاران اشاره کرد. هر دو مطالعه نشان‌دهنده کاهش بیان ژن *Bax* در نورون‌های رت‌های ایسکمیک بودند که تحت تیمار با نورواید قرار داشته‌اند (۹). با وجود آن که تحقیقات متعددی در رابطه با تاثیر کلستاز و نورواید بر بیان برخی از ژن‌های آپتوتیک وجود دارد؛ اما به غیر از مطالعه حاضر، تنها یک پژوهش نشان‌دهنده وجود ارتباط بین کلستاز و بیان ژن *Mcl-1* می‌باشد. یافته‌های Kahraman و همکاران نشان داد که افزایش بیان ژن *Mcl-1* در موش‌ها قادر است عوارض ناشی از کلستاز را کاهش دهد (۳۰). اگرچه که هر دوی ژن‌های *Mcl-1* و *Bcl2* آنتی آپتوتیک هستند؛ اما الزاماً نمی‌توان انتظار داشت که نتایج بیان ژن *Mcl-1* نیز مشابه *Bcl2* باشد؛ همان‌طور که در مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر، تاثیر کلستاز بر بیان این دو ژن کاملاً عکس هم مشاهده شد.

تحقیقات نشان داده‌اند که کلستاز قادر است باعث آسیب به بافت مغزی (۱۸)، ایجاد سمیت در کلیه (۱۹) و القای آپوپتوز در اندام‌هایی همچون قلب موش (۲۰)، کبد رت (۲۱) و موش (۲۲) و نیز کبد در افراد مبتلا به کلستاز شود (۲۳). آسیب ناشی از کلستاز به مغز و سیستم عصبی مرکزی، حیات و کیفیت زندگی بیمار را تحت تاثیرات جدی قرار می‌دهد. استریاتوم بخشی از عقده‌های قاعده‌ای مغز می‌باشد و به عنوان ساختاری برای ورودی داده‌ها به این بخش از مغز شناخته شده و در کنترل فعالیت‌های حرکتی و ادراک نقش ایفا می‌کند (۲۴). همچنین این بخش به همراه سایر نواحی عقده‌های قاعده‌ای در یادگیری چگونگی انتخاب فعالیت‌هایی که منجر به خروجی‌های پاداش می‌شوند، مشارکت می‌کند (۲۵). لذا اگر تحت تاثیر کلستاز دچار اختلال شود، عوارض شدیدی را به همراه خواهد داشت. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات کلستاز بر ناحیه استریاتوم مغز رت طراحی شد. از آنجا که کلستاز موجب آپوپتوز می‌شود، برای بررسی تاثیر آن بر ناحیه استریاتوم، تفاوت بیان ژن آنتی آپتوتیک *MCL-1* در ناحیه استریاتوم رت‌های سالم و رت‌های BDL اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. *MCL-1* با ممانعت از پیام‌رسانی یون کلسیم با میتوکندری و جلوگیری از آزاد شدن سیتوکروم c، نهایتاً مانع وقوع آپوپتوز از طریق مسیر داخلی آن می‌شود (۲۶). همچنین با توجه به مطالبی که قبلاً گفته شد، چون داروی نورواید دارای خاصیت ترمیم آسیب‌های وارده بر نورون‌هاست و می‌تواند موجب تکثیر آن‌ها شود، پس تاثیر تیمار رت‌های بیمار و سالم با داروی نورواید بر بیان این ژن نیز هدف دیگر این مطالعه بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهند که BDL بیان ژن *Mcl-1* را افزایش داده و داروی نورواید بیان آن را در رت‌های BDL تا

قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد (کد: ۱۳۶۳۰۵۰۳۹۴۲۰۰۹) انجام شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران می باشد. نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه مذکور تشکر می نمایند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران به شماره مرجع ۱۳۶۳۰۵۰۳۹۴۲۰۰۹ به تایید رسیده است.

منابع مالی

هزینه‌های این پروژه وابسته به هیچ سازمانی نبوده است.

منافع متقابل

نویسندگان منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

س ت، م و همکاران، طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته و همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

این اختلاف اثر را علاوه بر تفاوت ژن‌ها، می‌توان به متفاوت بودن نوع بافت‌های مورد مطالعه نیز نسبت داد. با توجه به اینکه تاکنون هیچ پژوهشی تاثیر نورواید را بر بیان ژن *Bcl2* بررسی نکرده است، پس نمی‌توان در رابطه با تاثیر نورواید بر بیان دو ژن *Mcl-1* و *Bcl2* مقایسه‌ای انجام داد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، BDL باعث افزایش بیان ژن *Mcl-1* در ناحیه استریاتوم مغز رت می‌شود و داروی نورواید می‌تواند این تغییر را خنثی نموده و بیان ژن *Mcl-1* را در رت‌های BDL کاهش دهد. به طوری که بیان ژن *Mcl-1* در رت‌های BDL که دارو دریافت کرده بودند با گروه کنترل تفاوتی نداشت. از سوی دیگر نتایج نشان دادند که نورواید نمی‌تواند بیان ژن *Mcl-1* در رت‌های سالم را تغییر دهد. از آن‌جا که در وقوع آپوپتوز، برای بیان تمامی ژن‌های آپوپتوتیک تعیین‌کننده می‌باشد، بنابراین نمی‌توان تنها بر اساس بیان یک یا چند ژن موثر در آپوپتوز درباره سرنوشت آن نتیجه‌گیری کرد. با توجه به این موضوع، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده جهت تعیین وقوع یا عدم وقوع آپوپتوز بیان تعداد بیشتری از ژن‌های آپوپتوتیک مورد بررسی قرار گیرد و با نتایج تحقیق حاضر مقایسه گردد.

References

- Ghonem N S, Assis D N, Boyer J L. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* 2015; **62**(2): 635-643. doi: 10.1002/hep.27744.
- Saleh H, Soliman A M, Mohamed A S, Marie M A. Antioxidant Effect of Sepia Ink Extract on Extrahepatic Cholestasis Induced by Bile Duct Ligation in Rats. *Biomed Environ Sci* 2015; **28**(8): 582-594. doi: 10.3967/bes.2015.082.
- Nguyen K D, Sundaram V, Ayoub W S. Atypical causes of cholestasis. *World J Gastroenterol* 2014; **20**(28): 9418-9426. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9418.
- Castro R E, Rodrigues C M. Cell Death and microRNAs in Cholestatic Liver Diseases: Update on Potential Therapeutic Applications. *Curr Drug Targets* 2015; **18**(8): 921-931.
- Savitskaya M A, Onishchenko G E. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* 2015; **80**(11): 1393-1417. doi: 10.1134/S0006297915110012.
- Renault T T, Chipuk J E. Death upon a kiss: mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis. *Chem Biol* 2014; **21**(1): 114-123. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.10.009.
- Westphal D, Dewson G, Czabotar P E, Kluck R M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**(4): 521-531. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.019.
- Khazaei Koohpar Z, Entezari M, Movafagh A, Hashemi M. Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of *Mcl-1* Gene. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 2015; **8**(3): e2331. doi: 10.17795/ijcp2331.
- Quintard H, Borsotto M, Veyssiere J, Gandin C, Labbal F, Widmann C, et al. MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacology* 2011; **61**(4): 622-631. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.003.
- Tsai M C, Chang C P, Peng S W, Jhuang K S, Fang Y H, Lin M T, et al. Therapeutic efficacy of Neuro Aid (MLC 601), a traditional Chinese medicine, in experimental traumatic brain injury. *J Neuroimmune Pharmacol* 2015; **10**(1): 45-54. doi: 10.1007/s11481-014-9570-0.
- Heurteaux C, Gandin C, Borsotto M, Widmann C, Brau F, Lhuillier M, et al. Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), a Chinese medicine, in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 2010; **58**(7): 987-1001. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.01.001.

12. Quintard H, Lorivel T, Gandin C, Lazdunski M, Heurteaux C. MLC901, a Traditional Chinese Medicine induces neuroprotective and neuro-regenerative benefits after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 2014; **277**: 72-86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.047.
13. Craig R W. MCL1 provides a window on the role of the *BCL2* family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002; **16**(4): 444-454. doi: 10.1038/sj.leu.2402416.
14. Reza Zarrindast M, Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nasehi M, Torabi Nami M. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. *Eur J Pharmacol* 2013; **702**(1-3): 25-31. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.023.
15. Behroozaghdam M, Hashemi M, Javadi G, Mahdian R, Soleimani M. Expression of *bax* and *bcl2* Genes in MDMA-induced Hepatotoxicity on Rat Liver Using Quantitative Real-Time PCR Method through Triggering Programmed Cell Death. *Iran Red Crescent Med J* 2015; **17**(11): e24609. doi: 10.5812/ircmj.24609.
16. Hashemi M. The Study of Pentoxifylline Drug Effects on Renal Apoptosis and *BCL-2* Gene Expression Changes Following Ischemic Reperfusion Injury in Rat. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 2014; **13**(1): 181-189.
17. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 2008; **10**(3): 1-3. doi: 10.1002/9780470089941.et1003s00.
18. Zarrindast M R, Hoseindoost S, Nasehi M. Possible interaction between opioidergic and cholinergic systems of CA1 in cholestasis-induced amnesia in mice. *Behav Brain Res* 2012; **228**(1): 116-124. doi: 10.1016/j.bbr.2011.11.039.
19. Deroee A F, Nezami B G, Mehr S E, Hosseini R, Salmasi A H, Talab S S, et al. Cholestasis induced nephrotoxicity: the role of endogenous opioids. *Life Sci* 2010; **86**(13-14): 488-492. doi: 10.1016/j.lfs.2010.02.005.
20. Shafaroodi H, Ebrahimi F, Moezi L, Hashemi M, Doostar Y, Ghasemi M, et al. Cholestasis induces apoptosis in mice cardiac cells: the possible role of nitric oxide and oxidative stress. *Liver Int* 2010; **30**(6): 898-905. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02249.x.
21. Tiao M M, Lin T K, Chen J B, Liou C W, Wang P W, Huang C C, et al. Dexamethasone decreases cholestatic liver injury via inhibition of intrinsic pathway with simultaneous enhancement of mitochondrial biogenesis. *Steroids* 2011; **76**(7): 660-666. doi: 10.1016/j.steroids.2011.03.002.
22. Bird M A, Lange P A, Schrum L W, Grisham J W, Rippe R A, Behrns K E. Cholestasis induces murine hepatocyte apoptosis and DNA synthesis with preservation of the immediate-early gene response. *Surgery* 2002; **131**(5): 556-563.
23. Ersoy A O, Kirbas A, Ozler S, Ersoy E, Ozgu-Erdinc AS, Ergin M, et al. Maternal and fetal serum levels of caspase-cleaved fragments of cytokeratin-18 in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; **29**(4): 562-566. doi: 10.3109/14767058.2015.1011116.
24. Tewari A, Jog R, Jog M S. The Striatum and Subthalamic Nucleus as Independent and Collaborative Structures in Motor Control. *Front Syst Neurosci* 2016; **10**: 17. doi: 10.3389/fnsys.2016.00017.
25. Wendler E, Gaspar J C, Ferreira T L, Barbiero J K, Andreatini R, Vital M A, et al. The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiol Learn Mem* 2014; **109**: 27-36. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.009.
26. Beilke L D, Aleksunes L M, Olson E R, Besselsen D G, Klaassen C D, Dvorak K, et al. Decreased apoptosis during CAR-mediated hepatoprotection against lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Toxicology letters* 2009; **188**(1): 38-44. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.03.005.
27. Mani A R, Nahavandi A, Moosavi M, Safarinejad R, Dehpour A R. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; **29**(10): 905-908.
28. Chae I H, Park K W, Kim H S, Oh B H. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by *Bax/Bcl-2* gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Chim Acta* 2004; **341**(1-2): 83-91. doi: 10.1016/j.cccn.2003.11.009.
29. Hayashi H, Naoi S, Hirose Y, Matsuzaka Y, Tanikawa K, Igarashi K, et al. Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption. *Hepatol Res* 2016; **46**(2): 192-200. doi: 10.1111/hepr.12561.
30. Kahraman A, Mott J L, Bronk S F, Werneburg N W, Barreyro F J, Guicciardi M E, et al. Overexpression of *mcl-1* attenuates liver injury and fibrosis in the bile duct-ligated mouse. *Dig Dis Sci* 2009; **54**(9): 1908-1917. doi: 10.1007/s10620-008-0583-5.

Original Article

Prevalence of otorhinolaryngology presentations in children with down syndrome

Yalda Jabbari Moghaddam¹, Mosleh Kadkhodamohammadi^{1*}, Mahnaz Sadeghi Shabestari², Shamsi Ghaffari³, Maryam Abbasnezhad⁴

¹Pediatric health research center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Pediatrics, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Pediatrics Cardiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Department of Internal Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: moslehkkm@gmail.com

Received: 2 September 2018 Accepted: 29 October 2018 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):30-37

Abstract

Background: The Down syndrome is the most common congenital anomaly which occurs 1 out of 700 births. Most of anomalies present in head and neck and the majorities are correctable by otorhinolaryngologists. The most ear, nose and throat (ENT) anomalies are chronic infectious otitis and chronic otitis media with effusion that are related to hearing loss, airway obstruction, obstructive sleep apnea, rhinitis and chronic sinusitis. In this study we decided to examine various ENT presentations in down patients.

Methods: A descriptive study in which we have evaluated 50 Azari infants of Tabriz center with Down syndrome approved by genetic and physical examinations between 0 and 15 years old, to realize Otorhinolaryngologic presentations.

Results: In this patients we studied the prevalence of: serous otitis, adenoid hypertrophy, cleft lip and cleft palate, tie-tongue, high arch palate, macroglossia, ear canal stenosis, septum deviation, rhinorrhea, allergic rhinitis, sleep apnea and daily sleepiness, fissured lip and tongue, saddle nose deformity, midface hypoplasia, columellar hanging and piriformis aperture stenosis.

Conclusion: Although the clinical manifestations of the Down syndrome are complex however the otorhinolaryngological evaluation of these patients by otorhinolaryngologists can be very useful in diagnosis, controlling and management of these patients.

Keyword: Down Syndrome, Ear Nose And Throat Presentations, Craniofacial Dysplasia, 21 Trisomy.

How to cite this article: Jabbari Moghaddam Y, Kadkhodamohammadi M, Sadeghi Shabestari M, Ghaffari Sh, Abbasnezhad M. [Prevalence of Otorhinolaryngology presentations in children with down syndrome]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):30-37. Persian.

مقاله پژوهشی

شیوع تظاهرات گوش، حلق و بینی در کودکان مبتلا به سندرم داون

یلدا جباری^۱، مصلح کدخداحمدی^{۱*}، مهناز صادقی شبستری^۲، شمس غفاری^۳، مریم عباس‌نژاد^۴

^۱ مرکز تحقیقات سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲ گروه کودکان و آلرژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳ گروه قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴ گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
 نویسنده مسوول: ایمیل: moslehkkm@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۳۰-۳۷

چکیده

زمینه: سندرم داون شایع‌ترین اختلال ژنتیکی مادرزادی است که تقریباً ۱ مورد در هر ۷۰۰ تولد رخ می‌دهد. اختلالات مربوط به سندرم داون به صورت عمده در ناحیه سر و گردن رخ می‌دهند که اکثر آنها قابلیت درمان توسط متخصصین گوش، حلق و بینی را دارا هستند. از تظاهرات شایع ENT در بیماران سندرم داون، می‌توان به عفونت مزمن گوش و افیوژن‌های مزمن گوش میانی که با افت شنوایی در ارتباط هستند، انسداد راه هوایی، آپنه‌ی انسدادی خواب، رینیت و سینوزیت مزمن اشاره کرد. در این مطالعه تظاهرات متعدد گوش، حلق و بینی را در بیماران سندرم داون مورد مطالعه قرار دادیم.

روش کار: تعداد ۵۰ کودک مبتلا به سندرم داون شهرستان تبریز در بازه سنی صفر تا ۱۵ سال تایید شده توسط آزمایش ژنتیک یا علایم بالینی را که از طریق مراکز بهزیستی شناسایی شده‌اند، انتخاب نموده و سپس ایشان را تحت معاینه قرار دادیم و پارامترهای مربوط به گوش، حلق و بینی را در آنها بررسی نمودیم.

یافته‌ها: در این بیماران فراوانی اوتیت سرروز، هیپرتروفی آدنوئید، شکاف لب و کام، فرنولوم چسبیده، قوس بلند کام، ماکروگلوسی، آترزی کانال گوش، انحراف سپتوم، رینوره، مخاط بینی آلرژیک، میزان آپنه شبانه و خواب‌آلودگی روزانه، شیار لب و زبان، بینی زینی شکل، هیپوپلازی میانه صورت، هنگینگ کولوملا و تنگی دهانه پیریفورم مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: اگر چه سندرم داون مجموعه‌ای از علایم بوده و کنترل آنها پیچیده و مشکل می‌باشد با این حال معاینه گوش، حلق و بینی در این بیماران بسیار حائز اهمیت بوده و متخصصین گوش، حلق و بینی نقش بسزایی در تشخیص، کنترل و درمان علایم این بیماران دارند.

کلید واژه‌ها: سندرم داون، تظاهرات گوش، حلق و بینی، دیس پلازی کرانیوفاسیال، تریزومی ۲۱

نحوه استناد به این مقاله: جباری ی، کدخداحمدی م، صادقی شبستری م، غفاری ش، عباس‌نژاد م. شیوع تظاهرات گوش، حلق و بینی در کودکان مبتلا به سندرم داون. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۳۰-۳۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

توصیف سندرم داون، برای نخستین بار در سال ۱۹۳۸ به شکل علمی صورت گرفت (۱). در اصطلاح ژنتیک، سندرم داون به تریزومی ۲۱ معروف می‌باشد. میزان ابتلا به سندرم داون به نژاد، جامعه و وضعیت اجتماعی و اقتصادی خانواده ارتباطی ندارد و بین دختران و پسران به یک نسبت رخ می‌دهد (۲). ریسک فاکتورهای اصلی زمینه ساز افزایش سندرم داون، افزایش سن مادر و سابقه‌ی ابتلای فرزند قبلی به سندرم داون می‌باشند (۳). سندرم داون سندرم کرانیوفاشیال است. هیپوتروفی و هیپوتونی عضلانی عمومی بدن و بویژه قسمت میانه صورت، ممکن است در اختلال عملکرد شیپور استنشاق، بویژه در دوران قبل از ورود به مدرسه نقش داشته باشد، ضمناً هیپرتروفی بافت لنفاوی ناحیه نازوفارنژیال در اختلال تهویه گوش میانی و تجمع مایع نقش دارد. در عین حال معاینه گوش کودکان مبتلا به داون، به سبب تنگی کانال گوش خارجی و عدم همکاری آنان ممکن است مشکل باشد. به سبب همین دلایل OME در اطفال شنوایی این کودکان دخیل دانسته شده است (۴)، که این اطفال شنوایی با توجه به عقب ماندگی ذهنی زمینه‌ای بیماران، سبب تاخیر بیشتر روند تکامل شناختی ایشان می‌گردد. در این بیماران آپنه انسدادی خواب شیوع فراوانی دارد هرچند که اغلب تشخیص داده نمی‌شود و حدود ۶۰٪ بیماران که توسط والدین خواب نرمال گزارش می‌شود در بررسی‌های انجام شده دچار آپنه می‌باشند و شیوع اختلالات انسدادی خواب حتی در بعضی مقالات تا ۱۰۰٪ بیان شده است. رینوره مزمن نیز با توجه به مشکلات آناتومیک نظیر هیپوپلازی میانه صورت یا تنگی حفره بینی یا هیپرتروفی آدنوئید در این بیماران شیوع بسیار بالایی دارد (۵). میزان اطفال شنوایی در بیماران سندرم داون حدود ۳۶٪ تخمین زده می‌شود که اغلب ناشی از مشکلات گوش میانی نظیر اوتیت سروز یا تجمع سرومن در کانال گوش می‌باشد (۶).

بیماران مبتلا به سندرم داون، کانال گوش خارجی کوچکتری دارند و به همین دلیل بیماری‌های مزمن گوش بیشتری نیز دارند و این بیماران ممکن است هر سه نوع اطفال شنوایی هدایتی، حسی و عصبی یا ترکیبی را داشته باشند که به همین دلیل تمامی این بیماران باید پس از ۳ سالگی هر ۶ ماه تا یکسال تحت ارزیابی رفتاری و شنوایی قرار گیرند و اگر کانال گوش خارجی تنگ است یا پرده شنوایی به خوبی دیده نمی‌شود باید به صورت مرتب تحت نظر متخصص گوش، حلق و بینی باشند، که این امر جهت تکامل زبان و گفتار این بیماران بسیار مهم است (۷). با توجه به جست و جویی که در این زمینه انجام دادیم مطالعه‌ای در این مورد در منطقه ما یافت نکردیم، لذا بر آن شدیم بررسی حاضر را انجام دهیم تا گامی در جهت شناسایی به هنگام این تظاهرات و اختلالات و درمان مناسب آنها برداریم.

روش کار

در این مطالعه توصیفی case series با توجه به حجم نمونه در مطالعات پیشین (۱۱ و ۱۰) و بدون استفاده از فرمول آماری تعداد ۵۰ بیمار مبتلا به سندرم داون تایید شده با تست ژنتیک یا علائم بالینی، در مراکز بهداشتی شهرستان تبریز که به صورت رندوم و با شماره‌گذاری مراکز داون به صورت اعداد فارسی و انتخاب شانس آن برگزیده شدند که بین سن ۰ تا ۱۵ سال بودند و شرایط ورود به مطالعه را داشتند انتخاب شدند.

محل انجام مطالعه مراکز بهداشتی و نگهداری کودکان مبتلا به سندرم داون تبریز بود. مدت انجام مطالعه به مدت ۱۳ ماه بود از اول اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶ لغایت اول خرداد ماه سال ۱۳۹۷ بود. سپس جمع‌آوری اطلاعات اولیه و تجزیه و تحلیل داده‌ها صورت پذیرفت.

این مطالعه به صورت یک مطالعه توصیفی طراحی شد. حجم نمونه مورد مطالعه با توجه به مطالعات مشابه قبلی و انحراف معیار شاخص‌های مورد آزمایش در مطالعات پیشین با سطح اطمینان ۹۵٪، حدود ۵۰ نفر برآورد شد. تعداد ۵۰ کودک مبتلا به سندرم داون را که ابتلای آنها به سندرم داون با بررسی کاریوتیپ یا علائم بالینی تایید شده بود از طریق هماهنگی با همکاران متخصص اطفال یا آمارگیری از مراکز بهداشتی و آزمایشگاه‌های ژنتیک شهرستان تبریز مورد بررسی قرار دادیم. بیماران مدنظر توسط یکی از اساتید ENT تحت معاینه بالینی کامل از نظر بررسی انحراف سپتوم بینی با کمک اسپکولوم، رینیت آلرژیک با کمک رینوسکوپ، وضعیت شکاف لب و کام، چسبندگی فرنولوم، High arc بودن کام، Occlusion فک، ابتلا به OME با کمک اتوسکوپ، وضعیت شنوایی با کمک PTA یا ABR، وجود آدنوئید با کمک Adenoid View X-ray، ابتلا به OSAS با کمک پرسشنامه مربوط به OSA قرار گرفتند. نتایج به صورت توصیفی وارد نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ گردید. سپس از روشهای آمار توصیفی به منظور خلاصه سازی و توصیف متغیرها استفاده شد.

۱. بررسی شکل ظاهری گوش، تنگی کانال و آترزی مجرای گوش و وضعیت شنوایی بیماران مبتلا به سندرم داون: تمامی ۵۰ بیمار تحت معاینه بالینی توسط متخصص ENT قرار گرفتند. سپس وضعیت شنوایی بیماران زیر ۳ سال توسط ABR و بالای سه سال توسط PTA بررسی و گزارش شد.
۲. بررسی تظاهرات بینی از جمله انحراف سپتوم و علائم آلرژی در بینی در بیماران مبتلا به سندرم داون: تمامی ۵۰ بیمار تحت معاینه بالینی توسط متخصص ENT قرار گرفتند، که طی آن انحراف سپتوم با کمک اسپکولوم و ابتلا به رینیت آلرژیک یا رینوره قدامی با کمک رینوسکوپ بررسی و گزارش شد.

شکاف کام نرم: در ۲٪ بود. فرنولوم چسبیده: ۴٪. قوس بلند کام: در ۲٪ موارد وجود داشت. مالاپیاتی: ۶۰٪ مالاپیاتی ۱، ۲۶٪ مالاپیاتی ۲، ۱۴٪ مالاپیاتی ۳ بودند. اکلوزن فک: ۹۴٪ کلاس ۱، ۴٪ کلاس ۲، ۲٪ کلاس ۳ بودند. ماکروگلووسی: ۷۲٪ بود. آترزی کانال گوشی نبود. تنگی کانال گوش: ۲۰٪ بود. مخاط بینی آلرژیک: ۴۸٪ بود. رینوره قدامی: در ۷۸٪ کودکان وجود داشت. مورفولوژی گوش: ۷۴٪ طبیعی، ۲۲٪ میکروتی ۱، ۴٪ میکروتی ۲ بودند. انحراف سیتوم: ۸۶٪ سیتوم در خط وسط، ۲٪ به سمت راست، ۱۲٪ به سمت چپ بود. زبان شیارداز: ۹۶٪ بود. لب شیارداز: ۶۰٪ بود. هیپوپلازی میانه صورت: ۳۸٪ بود. انحراف گردن: ۱۲٪ به سمت راست، ۳۰٪ به سمت چپ و ۵۸٪ انحراف گردن نداشتند. بینی زینی شکل: ۳۶٪ به صورت خفیف این حالت را داشتند. هنگینگ کولوما: ۱۴٪ بود. تنگی دهانه پیرفورم: ۴۶٪ بود. آپنه خواب و خواب آلودگی روزانه: ۶٪ بود.

بحث

در این مطالعه ۵۰ کودک مبتلا به سندرم داون در شهرستان تبریز تحت بررسی و معاینه گوش حلق بینی قرار گرفتند. سن و جنس و اوتیت سرور و میزان کاهش شنوایی، هیپرتروفی آدنوئید و گرید آن، شکاف لب و کام، میزان چسبندگی فرنولوم، میزان قوس کام، مالاپیاتی، اکلوزن فک، علایم آلرژی در مخاط بینی، ماکروگلووسی، آترزی مجرای گوش، تنگی کانال گوش، شکل ظاهری گوش و درجه میکروتی، وضعیت سیتوم بینی، هیپرتروفی لوزه کامی، میزان خواب آلودگی، زبان شیارداز، لب شیارداز، هیپوپلازی میانه صورت، بینی زینی شکل و دست غالب مورد بررسی قرار گرفتند. ۵۴٪ کودکان پسر و ۴۶٪ دختر بودند. گروههای سنی به سه گروه صفر تا ۵ سال، ۵ تا ۱۰ سال و ۱۰ تا ۱۵ سال تقسیم گردیده بود. اوتیت مدیای همراه با افیوژن شیوع ۱۰-۲۰٪ در بین سنین ۵-۲ سال در کودکان سالم دارد (۸). تا زمان رسیدن این کودکان به سن مدرسه ۹۰٪ آنها اپیزودهای اوتیت مدیای همراه با افیوژن دارند. با افزایش فعالیت شیپور استاش و کاهش عفونتهای راههای هوایی فوقانی با افزایش سن، شیوع OME (اوتیت مدیای همراه با افیوژن) به ۳-۴٪ کاهش پیدا می کند (۹).

در یک مطالعه که توسط Austeng و همکاران (۱۰) در سال ۲۰۱۰ در کشور نروژ روی ۵۳ نفر از کودکان سندرم داون در سن

۳. بررسی آدنوئید و قاعده جمجمه بیماران مبتلا به سندرم داون: تمامی ۵۰ بیمار تحت معاینه بالینی توسط متخصص ENT قرار گرفتند. سپس با Adenoid View X-ray مبتلا به آدنوئید تایید شد.

۴. بررسی تغییرات مربوط به دهان از جمله شکاف کام و لب، بالابودن قوس کام، فرنولوم چسبیده، وضعیت بزرگی لوزهها، زبان و Malocclusion فک: تمامی ۵۰ کودک تحت معاینه بالینی توسط متخصص ENT قرار گرفتند و رخداد هر کدام از موارد مذکور ثبت شد.

معیارهای ورود به مطالعه رضایت بیماران و والدین آنها جهت شرکت در این بررسی بودند و نیز معیارهای خروج از مطالعه هبترن بودند از سابقه ترومای کرانیوفیشیال و هرگونه بیماری زمینه‌ای همزمان با سندرم داون.

در خصوص ملاحظات اخلاقی تمامی معاینات و اقدامات صورت گرفته برای بیماران در راستای پیشگیری و درمان و پیگیری بیماری بوده و هزینه‌ای برای بیماران تحمیل نگردید. به بیماران و خانواده‌های آنان اطمینان داده شد که شرکت آنها در این مطالعه کاملاً داوطلبانه و محرمانه بوده در جایی نام و نشانی از آنها ذکر نشده است. کمال امانت داری در مورد اطلاعات شخصی افراد در طول مطالعه صورت گرفت. در ابتدای ورود به مطالعه هدف مطالعه به طور کامل به خانواده‌ها توضیح داده شد. از خانواده‌ها برگه رضایت آگاهانه در ابتدای ورود به مطالعه اخذ گردید. این مطالعه با کد اخلاقی IR. TBZMED.Rec. 1397. 026 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسیده است.

موارد بررسی شده: سن، جنس، انواع اختلالات گوش، حلق و بینی در بیماران بودند.

نتایج به صورت توصیفی وارد نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ شد سپس از روشهای آمار توصیفی (به صورت بیان درصدی نتایج) به منظور خلاصه سازی و توصیف متغیرها استفاده شد.

یافته‌ها

گروههای سنی: ۴۰٪ بیماران در بازه سنی ۵-۰ سال، ۲۲٪ بیماران در بازه سنی ۱۰-۵ سال و ۳۸٪ بیماران در بازه سنی ۱۵-۱۰ سال بودند.

جنسیت: ۵۴٪ پسر و ۴۶٪ دختر بودند.

اوتیت سرور: ۷۲٪ نرمال، ۲۰٪ خفیف، ۴٪ خفیف تا متوسط، ۴٪ متوسط بودند.

تنگی کانال گوش: ۲۶٪ بود.

تجمع سرومن در کانال گوش خارجی: ۶۰٪ بود
هیپرتروفی آدنوئید: ۹۴٪ گرید ۱، ۶٪ گرید ۲ داشتند.
شکاف لب نداشتند.

۸ سالگی انجام گردید، در اتومیکروسکوپی که در ۵۲ نفر انجام شد ۳۸٪ مبتلا به اوتیت مدیا همراه با افیوژن بودند. در معاینه بالینی ۱۷ کودک مبتلا بودند. میزان کاهش شنوایی بر اساس یافته‌های PTA (شنوایی سنجی با تون خالص) سازمان بهداشت جهانی تقسیم‌بندی شد که شامل: محدوده نرمال، کاهش شنوایی کمتر از ۲۵ دسی‌بل، خفیف بین ۲۵-۴۰ دسی‌بل، متوسط بین ۴۰-۶۰ دسی‌بل، شدید بیشتر از ۶۰ دسی‌بل. کاهش شنوایی بیشتر از ۲۵ دسی‌بل در ۶۰٪ کودکان با اوتیت مدیا همراه با افیوژن مشهود بود ($P < 0.001$). کودکان با OME کاهش شنوایی چشمگیری در مقایسه با کودکان بدون OME داشتند (۱۰). در مطالعه Manickam و همکاران نیز ۸۳٪ بیماران شنوایی نرمال یا نزدیک نرمال داشتند (۱۱). در مطالعه ما، از بین بیماران در بررسی اوتیت سرور و میزان کاهش شنوایی ۷۲٪ نرمال، ۲۰٪ خفیف، ۴٪ خفیف تا متوسط و ۴٪ متوسط بودند.

در مطالعه ای که Shott و همکاران (۱۱) روی ۱۵ بیمار مبتلا به سندرم داون انجام دادند، ۵۳٪ آنها هیپرتروپی آدنوئید داشتند. ۸۰٪ پتوز زبان، ۶۰٪ کلاپس نازوفارنکس، ۸۷٪ کلاپس هیپوفارنکس داشتند. در مطالعه ما، ۹۴٪ کودکان مورد بررسی هیپرتروپی آدنوئید گرید ۱ و ۶٪ گرید ۲ داشتند. در یک مطالعه که توسط Al Salloum و همکاران (۱۲) در سال ۲۰۰۴ در کشور عربستان روی ۴۵۶۸۲ کودک مبتلا به داون انجام شد فقط ۴ مورد شکاف لب داشتند. در مطالعه فعلی نیز هیچ کدام از بیماران شکاف لب نداشتند. در معاینه شکاف کام فقط ۲٪ شکاف کام در کام نرم داشته و بقیه سالم بودند. ۴٪ این کودکان فرنولوم چسبیده داشتند و ۹۶٪ نرمال بودند. ۲٪ قوس بلند کام داشتند. در بررسی مالاپاتی ۶۰٪ مالاپاتی ۱، ۲۶٪ مالاپاتی ۲، ۱۴٪ مالاپاتی ۳ داشتند. در مطالعه Fink و همکاران (۱۳)، درجه بالایی از نقص در ناحیه میانه صورت، قاعده جمجمه و ناحیه فرونتال و سینوسهای پارانازال در بیماران تریزومی ۲۱ مشاهده گردید. این خصوصیات کرانیوم باعث هیپوپلازی عمودی ساختارهای مرکزی کرانیوم و پایین آمدن ناحیه سلا تورسیکا و نهایتاً صاف شدن قاعده کرانیوم می‌شود. این دیس پلازی کرانیوم باعث باز شدن فک غیرطبیعی درجات ۱ و ۲ و ۳ می‌شود (۱۴). این مالفورماسیون در باز و بسته شدن فک در این کودکان اثرات قابل توجهی در آنها داشته و باعث اختلال در فعالیت‌های روزمره آنها می‌شود، ازجمله ظاهر، جویدن، بلعیدن و صحبت کردن می‌شود (۱۵). میزان این باز و بسته شدن غیرطبیعی فک در مطالعات مختلف بررسی شده است. ۹۴٪ کودکان مورد مطالعه کلاس باز شدن فک ۱، ۴٪ کلاس ۲، ۲٪ کلاس ۳ داشتند. ۴۸٪ مخاط بینی آلرژیک داشتند و ۵۲٪ نرمال بودند. ۷۲٪ ماکروگلوسیا داشتند و ۲۸٪ نرمال بودند. هیچ کدام از کودکان مورد بررسی آترزی کانال گوش نداشتند. ۲۰٪ بیماران تنگی کانال گوش داشتند و ۸۰٪ کانال گوش طبیعی داشتند. ۷۴٪ مورفولوژی گوش

طبیعی داشتند و ۲۲٪ میکروتی ۱ و ۴٪ میکروتی ۲ بودند. در ۸۶٪ کودکان سپتوم بینی در خط وسط قرار داشت و در ۲٪ انحراف بینی به سمت راست و در ۱۲٪ انحراف به سمت چپ بود. آپنه انسدادی خواب شیوع بالایی در سندرم داون دارد و باعث فشار بالای ریوی و نارسایی احتقانی قلب می‌شود. آپنه انسدادی خواب در بیماران داونی به وسیله علل متفاوتی ایجاد می‌شود که شامل: کوچک بودن میانه صورت و کرانیوم، نازوفارنکس باریک، زبان بزرگ، مندیبل هیپوپلاستیک، استعداد چاقی، افزایش ترشحات، هیپوتونی عضلانی و هیپرپلازی لنفوئید است (۱۶ و ۱۷). این کودکان حنجره نسبتاً کوچکی دارند و در بعضی از آنها ناهنجاری های شدید حنجره و تراشه دیده می‌شود (۱۸) به طوری که در بعضی از آنها نیاز به عمل آدنوتونسیلکتومی برای حذف انسداد می‌باشد (۱۹). اگر چه این درمان کامل نیست ولی به عنوان قدم اول پیشنهاد شده است (۲۰) ولی میزان موثر بودن آن نسبت به کودکان سالم کمتر است (۲۱).

در مطالعه‌ای که توسط Thottam و همکاران (۱۶) در سال ۲۰۱۵ انجام گردید نشان داده شد که ۴۱/۶٪ بیماران با آپنه انسدادی خواب همچنین مبتلا به آپنه مرکزی خواب نیز می‌باشند. بین آپنه انسدادی و مرکزی چرخه معیوبی برقرار است. با این توضیح که زمانی که به دلیل مقاومت راههای هوایی میزان دی اکسید کربن خون بالا می‌رود، این حالت باعث تحریک کمورسپتورهای مرکزی می‌شود و این حالت باعث شل شدن بیشتر راههای هوایی فوقانی و فعالیت ناهماهنگ عضلات تنفسی می‌شود. در مطالعه ما ۹۴٪ کودکان اختلال خواب را ذکر نمی‌کردند و اظهار داشتند که کیفیت خواب مناسب دارند و ۶٪ نسبتاً خواب آلودگی داشتند و برای هیچ کدام از کودکان مورد مطالعه پلی‌سومنوگرافی انجام نشده بود. زبان شیاردار شایع‌ترین یافته بافت نرم داخل دهان است و شیوع آن بین ۱۰ تا ۹۵٪ در مطالعات مختلف گزارش شده است (۲۳) و شیوع آن با افزایش سن افزایش پیدا می‌کند (۲۴). فراوانی زبان شیاردار در جمعیت عادی بین ۰/۶ تا ۳۰/۶٪ است (۲۵).

علل لب شیاردار هنوز دقیق مشخص نشده است. در جمعیت عادی کمبود مادرزادی در تعداد و اندازه غدد موكوسی لب‌ها به عنوان یکی از علل شیارها مطرح شده است ولی هیچ شواهدی از این تئوری در بیماران سندرم داون یافت نشده است. علل دیگر مطرح شده شامل: تنفس دهانی، آویتامینوزیس، فعالیت در فضای باز، سیگار و عفونت‌های قارچی و باکتریال هستند (۲۶). التهاب گوشه لبها بیشتر به دلیل عفونت کاندیدا آلیکنز در این بیماران است که به دلیل درولینگ و نقص ایمنی می‌باشد (۲۷). در مطالعه‌ای که در یمن توسط Al-Maweri و همکاران (۲۴) در سال ۲۰۱۴ انجام شد، نتایج حاکی از شیوع بالای ناهنجاری‌های لب و دهان و زبان در کودکان مبتلا به سندرم داون بود. در این مطالعه که

نتیجه‌گیری

اگر چه سندرم داون مجموعه‌ای از علایم بوده و کنترل آنها پیچیده و مشکل می‌باشد با این حال معاینه گوش، حلق و بینی در این بیماران حائز اهمیت است و متخصصین محترم گوش، حلق و بینی نقش بسزایی در کنترل و تشخیص کنترل و درمان علایم این بیماران می‌توانند ایفا نمایند.

قدردانی

این تحقیق در دانشگاه علوم پزشکی تبریز در قالب پایان نامه انجام شده است. از مراکز بهزیستی شهرستان تبریز و اساتید محترم اطفال و گوش حلق بینی به دلیل معرفی بیماران و پیگیری ایشان صمیمانه قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد

منابع مالی

ندارد

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مولفان

ی. ج. م. ک و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. ی. ج. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را مطالعه و تایید نموده است.

روی ۵۰ بیمار داونی بین سنین ۶ تا ۱۸ سال انجام شد، ۷۸٪ زبان شیاردار، ۶۴٪ شیاردار لب، ۳۸٪ ترکهای گوشه لب، ۱۴٪ التهاب لب داشتند. بیشتر شیادهای لب در لب پایین بود و ۸۰٪ شیادهای در خط وسط بود ($P > 0.001$). در مطالعه‌ای که توسط Scully و همکاران در سال ۲۰۰۲ در ۷۷ بیمار داونی انجام گرفت، حداقل ۲۵٪ لب شیاردار داشته و در کشت از آنها سوش غالب کاندیدا آلبیکنز بود (۲۶).

در مطالعه Shukla و همکاران (۲۸) ۹۷٪ شایع‌ترین یافته در این بیماران زبان شیاردار بود و بعد از آن شایع‌ترین یافته ماکروگلوژی بود. در معاینه کودکان در مطالعه ما زبان شیاردار فقط در ۴٪ کودکان این مورد مشاهده نگردید و در ۹۶٪ موارد زبان شیاردار داشتند. ۶۰٪ بیماران لب شیاردار داشتند و در ۴۰٪ نرمال بود. ۳۸٪ این کودکان هیپوپلازی میانه صورت داشتند و ۶۲٪ نرمال بودند.

در معاینه جهت انحراف گردن ۱۲٪ انحراف به سمت راست، ۳۰٪ انحراف به چپ و ۵۸٪ بدون انحراف بودند. ۹۰٪ کودکان راست دست و ۱۰٪ چپ دست بودند.

در مطالعه Cicero و همکاران (۲۹) ۶۱٪ هیپوپلازی استخوان یا غضروف بینی داشتند و در مطالعه دیگری که روی ۲۰۲ بیمار داونی انجام شد ۹۶ مورد بینی زینی شکل داشتند. در مطالعه ما، بینی ۳۶٪ کودکان تغییر شکل زینی بینی خفیفی را داشتند ولی ۶۴٪ نرمال بودند.

۱۴٪ دچار هنگینگ کولوملا بودند و ۸۶٪ نرمال بودند. در مطالعه ما ۴۶٪ تنگی دهانه پیریفرم داشتند و ۵۴٪ نرمال بودند.

در مطالعه Edward و همکاران نیز شیوع تنگی کانال گوش در این بیماران بسیار بیشتر بود. در مطالعه ما نیز شیوع بستر از افراد نرمال جامعه و در حدود ۲۰٪ بود. (۳۰). در آخر لازم است متذکر شود علت اختلاف نتایج مطالعه ما با بقیه مطالعات می‌تواند ناشی از تفاوت‌های نژادی یا حجم پایین نمونه باشد که برای بررسی دقیق‌تر توصیه به انجام مطالعه در حجم وسیع‌تر و از نژادهای مختلف می‌شود.

References

- Behrman R E, Kliegman R M, Jenson H B. *Nelson textbook of pediatric*. 19th ed. Chicago, W.B. Saunders, 2011. Chapter 76.2
- Adams M, Erickson J D, Layde P M. Down syndrome. Recent trends in the United States. *JAMA* 1981; **246**: 758-765. doi: 10.1001/jama.246.7.758
- FarshbafKhalili A, Shahnazi M, HajizadehKh, ShekariKhaniani M. Down syndrome screening methods in Iranian pregnant women. *Journal of Caring Sciences* 2012; **1**(3): 145-151. doi: 10.5681/jcs.2012.021
- McPherson B, Lai S P, Leung K K, Ng I H. Hearing loss in Chinese school children with down syndrome. *Int J Pediatric Otorhinolaryngology* 2007; **71**(12): 1905-1915. doi: 10.1016/j.ijporl.2007.09.003
- Shott S R. Down syndrome: common otolaryngology manifestations. *Am J Med Genet C: Semin Med Genet* 2006; **142**(3): 131-140. doi: 10.1002/ajmg.c.30095
- Nightengale E. Hearing Loss in Children with Down syndrome. *The Hearing Journal* [Internet] 2018; **71**(2): 10. doi: 10.1097/01.hj.0000530645.24806.bf
- Chin Ch J, Khami M M, Husein M. A general review of the otolaryngology manifestations of Down

- syndrome. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2014; **78**: 899-904. doi: 10.1016/j.ijporl.2014.03.012
8. Ruben R. Management of otitis media and otitis media with effusion in the speech-delayed child, in: C.M. Alper, C.D. Bluestone, M.L. Casselbrant, J.E. Dohar, E.M. Mandel (Eds.), *Advanced Therapies of Otitis Media*. 1st ed. BC Decker Inc, London, 2004; PP: 203-210. doi: 10.1542/peds.113.5.1451
9. Daly K A, Selvius R E, Lindgren B. Knowledge and attitudes about otitis media risk: implications for prevention. *Pediatrics* 1997; **100**(6): 931-936. doi: 10.1542/peds.100.6.931
10. Austeng M E, Akre H, Øverland D, Abdelnoor M, Falkenberg E S, Kværner K J. Otitis media with effusion in children with in Down syndrome. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2013; **77**: 1329-1332. doi: 10.1016/j.ijporl.2013.05.027
11. Manickam V, Shott G S, Heithaus D, Shott S R. Hearing loss in Down syndrome revisited -15 years later. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2016; **88**: 203-207. doi: 10.1016/j.ijporl.2016.07.012
12. Al Salloum A, El Mouzan M I, Al Herbish A, Al Omer A, Qurashi M. Prevalence of selected congenital anomalies in Saudi children: a community-based study. *Annals of Saudi Medicine* 2015; **35**(2): 107-110. doi: 10.5144/0256-4947.2015.107
13. Fink G B, Madaus W K, Walker G F. A quantitative study of the face in Down's syndrome. *Am Journal Orthod* 1975; **67**: 540-553. doi: 10.1016/0002-9416(75)90299-7
14. Alio J J, Lorenzo J, Iglesias C. Cranial base growth in patients with Down syndrome: A longitudinal study. *Am J OrthodDentofacialOrthop* 2008; **133**: 729-737. doi: 10.1016/j.ajodo.2006.03.036
15. Venail F, Gardiner Q, Mondain M. ENT and speech disorders in children with Down's syndrome: an overview of pathophysiology, clinical features, treatments, and current management. *Clin Pediatr (Phila)* 2004; **43**: 783-791. doi: 10.1177/000992280404300902
16. Thottam P J, Choi S, Simons J P, Kitsko D J. Effect of adenotonsillectomy on central and obstructive sleep apnea in children with down syndrome. *Otolaryngology Head Neck Surg* 2015; **153**(4): 644-648. doi: 10.1177/0194599815587877 (Epub 2015 Jun 4).
17. Bassell JL, Phan H, Leu R, Kronk R, Visootsak J. Sleep profiles in children with Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2015; **167A**(8): 1830-1835. doi: 10.1002/ajmg.a.37096 (Epub 2015 Jun 23).
18. Hamilton J, Yaneza MMC, Clement W A, Kubba H. The prevalence of airway problems in children with Down's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2016; **81**: 1-4. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.11.027 (Epub 2015 Dec 07).
19. Ramia M, Musharrafieh U, Khaddage W, Sabri A. Revisiting Down syndrome from the ENT perspective: review of literature and recommendations. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014; **271**(5): 863-869. doi: 10.1007/s00405-013-2563-4 (Epub 2013 May 21).
20. Merrell J A, Shott S R. OSAS in Down syndrome: T&A versus T&A plus lateral pharyngoplasty. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; **71**(8): 1197-1203. (Epub 2007 May 29). doi: 10.1016/j.ijporl.2007.04.009
21. Shete M M, Stocks R M, Sebelik M E, Schoumacker R A. Effects of adeno-tonsillectomy on polysomnography patterns in Down syndrome children with obstructive sleep apnea: a comparative study with children without Down syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; **74**(3): 241-244. doi: 10.1016/j.ijporl.2009.11.006 (Epub 2010 Jan 25).
22. Mucocutaneous Findings in 100 Children with Down syndrome. *Pediatric Dermatology* 2016; **33**(3): 362. doi: 10.1111/pde.12883
23. Erics M, Balci S, Atakan N. Dermatological manifestations of 71 Down syndrome children admitted to a clinical genetics unit. *Clinical Genetics* 2008; **50**(5): 317-320. doi: 10.1111/j.1399-0004.1996.tb02381.x
24. Al-Maweri S A, Al-Soneidar W A, Halboub E S. Oral lesions and dental status among institutionalized orphans in Yemen: A matched case-control study. *Contemp Clin Dent* 2014; **5**: 81-84. doi: 10.4103/0976-237x.128673
25. Rosenquist B. Median lip fissures: etiology and suggested treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; **72**: 10-14. doi: 10.1016/0030-4220(91)90180-k
26. Scully C, van Bruggen W, Diz Dios P, Casal B, Porter S, Davison M F. Down syndrome: lip lesions (angular stomatitis and fissures) and Candida albicans. *Br J Dermatol* 2002; **147**: 37-40. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04741.x
27. Al-Maweri S A, Tarakji B, Al-Sufyani G A, Al-Shamiri H M, Gazal G. Lip and oral lesions in children with Down syndrome. A controlled study. *J Clin Exp Dent* 2015; **7**(2): e284-288. doi: 10.4317/jced.52283.
28. Shukla D, Bablani D, Chowdhry A, Thapar R, Gupta P, Mishra S. Dentofacial and Cranial Changes in Down

- Syndrome. *Osong Public Health and Research Perspectives* 2014; 5(6): 339-344. doi: 10.1016/j.phrp.2014.09.004
29. Cicero S, Sonek J D, McKenna D S, Croom C S, Johnson L, Nicolaides KH. Nasal bone hypoplasia in trisomy 21 at 15-22 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21(1): 15-18. doi: 10.1002/uog.19.
30. Dy AES, Lapeña JFF. External Auditory Canal Dimensions, Age, and Cerumen Retention or Impaction in Persons with Down Syndrome. *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology* 2018; 127(4): 253-257. doi: 10.1177/0003489418756678

Original Article

The effect of eight weeks pilates training on plasma irisin levels and anthropometric parameters in overweight women

Afsaneh Khosravi¹ , Maryam Keshvari^{2*} , Mir Abdullah Tahramuzi³

¹Ph.D Student in Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran

²Ph.D Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Lorestan, Khorramabad, Iran

³Ph.D Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil, Iran

*Corresponding author; E-mail: keshvari_maryam@yahoo.com

Received: 6 May 2017 Accepted: 18 June 2017 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):38-46

Abstract

Background: Exercise training is always known as one of the most important workout strategies to treat and prevent fat accumulation, obesity and related diseases in all age groups. The aim of this study is to investigate the effect of 8 weeks pilates training on resting levels of irisin and anthropometric obesity indexes in overweight middle-aged women.

Methods: In this semi-experimental study, 20 women with regular menstrual cycles and body mass index (30-25) were voluntarily chosen and randomly divided into two groups, Pilates and control. Pilates group trained 8 weeks, three time per week. Blood samples from participants were taken 12 hours before pre-test and also at the end of the exercise protocol after 48 hours of fasting state in two stages. Data were analyzed using the independent samples T-test and paired samples T-test ($p < 0.05$).

Results: Paired t-test results for plasma irisin in training group showed a significant increase after 8 weeks pilates training ($p = 0.00$). As well as the arms, abdomen, hips, thighs, weight and body mass index after training in the Pilates group was significantly reduced ($p < 0.05$) and control group showed no significant change compared to the start of the study ($p > 0.05$). Comparison of means between groups by independent t-test was significant only in irisin variable compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: It seems Pilates exercise can effect on irisin plasma levels and anthropometric indexes in overweight women.

Keyword: Pilates, Irisin, Overweight.

How to cite this article: Khosravi A, Keshvari M, Tahramuzi M A. [The effect of eight weeks pilates training on plasma irisin levels and anthropometric parameters in overweight women]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):38-46. Persian.

مقاله پژوهشی

تاثیر هشت هفته تمرینات پیلاتس بر سطوح آیریزین پلاسما و شاخص‌های آنتروپومتریک در زنان دارای اضافه وزن

افسانه خسروی^۱، مریم کشوری^{۲*}، میرعبداله طهرآموزی^۳

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
^۲ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
^۳ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

* نویسنده مسوول: ایمیل: keshvari_maryam@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۸ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۳۸-۴۶

چکیده

زمینه: تمرین ورزشی همواره به عنوان یکی از مهمترین راهکارهای درمانی و پیشگیری از تجمع چربی، چاقی و بیماری‌های ناشی از آن در همه رده‌های سنی شناخته شده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۸ هفته تمرینات پیلاتس بر سطوح استراحتی آیریزین و شاخص‌های چاقی آنتروپومتریک زنان دارای اضافه وزن میانسال است.

روش کار: در این تحقیق نیمه تجربی، ۲۰ زن دارای اضافه وزن باشگاه آروشای شهر خرم‌آباد، با دوره قاعدگی منظم و شاخص توده بدنی (۲۵-۳۰) کیلوگرم بر متر مربع) به صورت داوطلبانه انتخاب و بطور تصادفی به دو گروه تمرین پیلاتس و کنترل تقسیم شدند. گروه پیلاتس به مدت ۸ هفته، هر هفته ۳ جلسه تمرین کردند. عمل خونگیری بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی پیش از تمرین و در پایان پروتکل تمرینی بعد از ۴۸ ساعت استراحت و حالت ناشتایی در دو مرحله، صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های t وابسته و t مستقل انجام گرفت ($p < 0.05$).

یافته‌ها: نتایج آزمون تی همبسته برای آیریزین پلاسما در گروه تمرینی بعد از ۸ هفته تمرین پیلاتس افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p = 0.00$). همچنین محیط بازو، شکم، لگن، ران، وزن و شاخص توده بدنی پس از تمرین در گروه پیلاتس از نظر آماری کاهش معناداری یافت ($p < 0.05$) و در گروه کنترل نسبت به ابتدای پژوهش تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). مقایسه میانگین بین گروهی تنها در متغیر آیریزین نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p > 0.05$). نتیجه‌گیری: باتوجه به نتایج بدست آمده، بنظر می‌رسد انجام تمرین پیلاتس بمدت ۸ هفته می‌تواند بر سطوح پلاسمای آیریزین و شاخص‌های آنتروپومتریک در زنان دارای اضافه وزن مؤثر باشد.

کلید واژه‌ها: تمرین پیلاتس، آیریزین، اضافه وزن

نحوه استناد به این مقاله: خسروی ا، کشوری م، طهرآموزی م. ع. تأثیر هشت هفته تمرینات پیلاتس بر سطوح آیریزین پلاسما و شاخص‌های آنتروپومتریک در زنان دارای اضافه وزن. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۱(۲): ۳۸-۴۶

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

چاقی یک بیماری مزمن است که شیوع آن در بالغین، نوجوانان و کودکان در حال افزایش بوده و در حال حاضر به عنوان یک اپیدمی جهانی در نظر گرفته می‌شود. عدم تعادل بین دریافت مصرف انرژی منجر به افزایش ذخایر چربی بدن می‌شود. راهکارهای پیشگیرانه از چاقی نیز با دستکاری این دو عامل مؤثر بر موازنه انرژی، یعنی رژیم غذایی و فعالیت ورزشی مرتبط هستند و مطالعات زیادی تأثیر مثبت انواع تمرین ورزشی را در کاهش چربی، اضافه وزن و بیماری‌های مرتبط با آن نشان داده‌اند؛ هنگامی که ذخایر چربی افزایش می‌یابد، سلول‌های بافت چربی رشد کرده و بزرگ می‌شوند که این فرایند منجر به بروز چاقی می‌گردد. چاقی ناشی از بزرگ شدن سلول‌های چربی (هایپرتروفی) اغلب با خطر ابتلا به اختلالات متابولیک مانند عدم تحمل گلوکز، دیس‌لیپیدمی، فشارخون بالا و بیماری‌های قلبی-عروقی ارتباط دارد (۱). اگرچه داشتن حداقل میزان چربی برای عملکرد مناسب سیستم هورمونی، باروری و ایمنی ضروری است، اما تجمع بیش از حد چربی با بروز اختلالات متابولیکی همراه است. چاقی علاوه بر BMI بر اساس الگوی توزیع چربی در بدن نیز تعریف می‌شود. چاقی عمومی افزایش تجمع چربی در تمام قسمت‌های بدن است، اما چاقی شکمی تجمع بیش از حد چربی در ناحیه شکم بوده و پیامد آن افزایش اندازه دور کمر است. افزایش تجمع چربی در ناحیه مرکزی در مقایسه با تجمع آن در ناحیه محیطی با خطر مرگ و میر بیشتری همراه است. چاقی شکمی عامل پیشگویی کننده اصلی بیماری‌های مرتبط با چاقی به خصوص اختلالات متابولیک و بیماری‌های قلبی و عروقی است. افزایش سن و به موازات آن کاهش فعالیت بدنی و سوخت و ساز پایه باعث افزایش تجمع چربی در ناحیه شکم می‌شود. شواهد نشان می‌دهد عدم فعالیت بدنی از علل اصلی افزایش میزان شیوع چاقی و یک عامل خطرزای مهم برای تهدید سلامت عمومی افراد محسوب می‌شود (۲). چاقی در اثر عدم تعادل انرژی دریافتی (انرژی مربوط به غذاها) و انرژی مصرفی (انرژی مربوط به متابولیسم پایه و فعالیت بدنی) ایجاد می‌شود (۳). روند افزایش سن و گذر از مرحله جوانی به مراحل بزرگسالی و میانسالی با تغییرات منفی و تحلیل برنده آناتومیک و فیزیولوژیک فراوانی در بدن مرتبط است که یکی از این تغییرات، کاهش در میزان متابولیسم پایه (Basal Metabolic Rate, BMR)، تحلیل و آتروفی عضلانی و افزایش بافت توده چربی و در نتیجه مستعد شدن برای چاقی و بیماری‌های وابسته به آن می‌باشد (۴). از سوی دیگر اغلب افراد به علت کاهش توانمندی‌های حرکتی و تلقینات روانی ناشی از افزایش سن، وقت کم تمایل زیادی به انجام فعالیت ورزشی ندارند و در نتیجه با کاهش عوامل مؤثر در هزینه انرژی، توازن انرژی دریافتی و مصرفی در آن‌ها به هم می‌خورد و خطر ابتلا به چاقی و بیماری

های مرتبط با آن افزایش می‌یابد. در این میان زنان میانسال بیشتر در معرض خطر مبتلا شدن به بیماری‌های ناشی از فقر حرکتی هستند: به علت نزدیک شدن به دوران یائسگی و کاهش پیش رونده هورمون‌های جنسی زنانه که در متابولیسم موثر چربی و کنترل وزن نقش به سزایی دارند (۵). احتمالاً زنان میانسال یکی از مستعدترین اقشار جامعه برای ابتلا به چاقی و خطرات و بیماری‌های مرتبط با آن هستند. چاقی و عوارض آن با مدیریت صحیح و از طریق کنترل رژیم غذایی، دارو و ورزش قابل درمان و پیشگیری است که در این بین فعالیت بدنی به عنوان روشی مناسب و کم هزینه و بدون عوارض در درمان چاقی مورد توجه قرار گرفته است. ورزش و فعالیت بدنی یکی از مداخلات رفتاری مهم در برنامه‌های کاهش وزن کوتاه مدت (به ویژه وقتی با تغییرات رژیم غذایی همراه باشد) و یکی از عوامل تعیین کننده در برنامه‌های کاهش وزن بلند مدت است. چاقی اکسیداسیون اسیدهای چرب را در عضلات کاهش می‌دهد، این نقص در اکسیداسیون باعث افزایش اندوخته چربی می‌شود. این در حالی است که تمرین ورزشی در همه افراد اکسیداسیون اسیدهای چرب را افزایش می‌دهد و به خصوص در افراد چاقی که کاهش وزن داشته‌اند این تغییرات ادامه‌دار است؛ زیرا تمرین، تعداد میتوکندری و اکسیداسیون اسیدهای چرب را افزایش داده و مصرف ماکرومولکول را بالا می‌برد (۲). بنابراین، تمرین ورزشی همواره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راهکارهای درمانی و پیشگیری از تجمع چربی، چاقی و بیماری‌های ناشی از آن در همه رده‌های سنی شناخته شده است (۶). مطالعات جدید نشان داده‌اند که برخی مایوکاین‌ها که در اثر تمرین ورزشی از عضلات ترشح می‌شوند در تنظیم اکسیداسیون چربی و کاهش چاقی مؤثرند. یکی از مهمترین این مایوکاین‌ها آیریزین می‌باشد. آیریزین پپتیدی متشکل از ۱۱۲ اسید آمینه است که در اثر انقباضات عضلانی ناشی از تمرین ورزشی و افزایش القای (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) α 1 PGC-1 coactivator (PGC-1 α) از تجزیه یک پیش ساز به نام (Fibronectin type III domain-containing protein 5, FNDC5) در عضلات ساخته می‌شود و سپس با ورود به گردش خون و تأثیر بر سلول‌های بافت چربی سفید باعث افزایش بیان ژن پروتئین جفت نشده نوع ۱ (UCP1) می‌شود که این پروتئین با افزایش هزینه انرژی و گرمایی در میتوکندری مرتبط است (۷). به علاوه آیریزین با افزایش بیان ژن‌های مؤثر در افزایش بیورژن میتوکندری در تغییر فنوتیپ بافت چربی سفید به چربی قهوه‌ای که خود عامل بسیار مؤثری در افزایش متابولیسم چربی و کاهش وزن می‌باشد نیز نقش دارد (۸). در همین راستا مطالعات نشان داده‌اند که انواع تمرین ورزشی استقامتی و مقاومتی با افزایش میزان آیریزین همراه بوده‌اند و این افزایش، ارتباط قوی منفی با تغییرات

سرمی آیریزین و شاخص مقاومت به انسولین بررسی کردند اما نتایج تحقیق تغییرات معناداری را نشان نداد (۱۵)؛ همچنین Moienneia و همکاران به مقایسه اثر یک دوره برنامه تمرین مقاومتی با شدت‌های مختلف بر سطوح سرمی آیریزین زنان جوان غیر فعال پرداختند و نتایج نشان داد یک دوره تمرین مقاومتی با شدت‌های کم و زیاد نمی‌تواند سبب افزایش سطوح آیریزین در زنان جوان غیر فعال شود (۱۶). نتایج تحقیق Jabari و همکاران که تأثیر یک جلسه فعالیت استقامتی زیر بیشینه بر میزان آیریزین پلاسما و چهار هفته تمرین تناوبی با شدت بالا و حجم پایین بر میزان استراحتی آیریزین و میزان آیریزین پلاسما پس از یک وهله فعالیت استقامتی زیربیشینه در مردان جوان انجام دادند همسو با نتایج تحقیق حاضر است (۱۷). Miyamoto و همکاران به بررسی تغییرات آیریزین پلاسمایی و ارتباطش با تغییرات بافت چربی، احشایی و زیرپوستی و کلی بدن در افراد میانسال و جوان متعاقب انجام تمرینات استقامتی پرداخت و نشان داد که ۸ هفته تمرین استقامتی باعث افزایش معناداری در میزان آیریزین پلاسمایی و کاهش معنی‌داری در میزان هر سه نوع چربی احشایی، زیرپوستی و کلی بدن در افراد میانسال شده است (۱۸). Tsuchiya و همکاران به مقایسه اثر ۳ نوع فعالیت حاد استقامتی، مقاومتی و ترکیبی بر پاسخ مقادیر آیریزین پلاسمایی پرداختند و نشان دادند که فعالیت مقاومتی در مقایسه با دو نوع فعالیت استقامتی و ترکیبی تأثیر افزایشی معنادارتری به دنبال دارد (۱۹). با توجه به تحقیقات انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که انواع تمرینات پیلاتس، استقامتی، مقاومتی و ... در تغییرات ترکیب بدنی، میزان چربی و چاقی موثر باشد و گاهی نیز به دلیل پروتکل تمرینی، سن، جنس نتایج متناقض بوده است. از طرفی با توجه به محبوبیت رشته پیلاتس و گرایش روز افزون زنان به این رشته به دلیل آسیب کمتر و تقویت عضلانی و تشابه تمرینات پیلاتس به تمرینات استقامتی زیربیشینه از نظر شدت، مدت و زمان درگیری عضلات بدن، تحقیق حاضر تأثیر هشت هفته تمرین پیلاتس بر سطوح پلاسمایی آیریزین و شاخص‌های آنتروپومتریک در زنان دارای اضافه وزن را بررسی می‌کند.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع کاربردی و به روش نیمه‌تجربی با یک گروه تجربی و یک گروه کنترل و با طرح پیش‌آزمون-اعمال متغیر مستقل - پس آزمون به انجام رسید. شرکت کنندگان در این پژوهش زنان میانسال غیرفعال بودند، که از میان مراجعه کنندگان به باشگاه ورزشی آروشای خرم آباد که در محدوده توده بدنی ۲۵-۳۰ قرار داشتند، برای شرکت در مطالعه انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از: نداشتن هیچ‌گونه بیماری، داشتن دوره قاعدگی منظم سبک زندگی کم تحرک، توانایی انجام حرکات ورزشی، شرکت نکردن در برنامه ورزشی حداقل شش ماه پیش از

انواع چربی احشایی، زیرپوستی و کلی بدن داشته است (۹). که این خود می‌تواند نشان‌دهنده نقش مهم آیریزین در کاهش بافت چربی تمرین ورزشی باشد. با وجود این، اکثر مطالعات انجام شده در این زمینه تنها تأثیر انواع تمرینات سستی مانند تمرینات استقامتی و مقاومتی و ترکیبی را بر ترکیب بدنی، میزان چربی، چاقی و میزان آیریزین پلاسمایی نشان داده اند (۱۰). تأثیر تمرینات به روزتر مانند تمرینات پیلاتس بر تحریک و تشریح آیریزین و در نتیجه تغییرات بافت چربی و کاهش اضافه وزن و چاقی هنوز در هاله‌ای از ابهام است. لذا با توجه به اهمیت برنامه‌های ورزشی در کاهش چربی، اضافه وزن و بیماری‌های مرتبط با آن، برداشتن گام‌هایی در جهت شناسایی مشخصات فعالیت ورزشی مؤثرتر و غنی ساختن این برنامه‌ها از طریق روشن کردن تأثیر آن‌ها بر مکانیسم‌های موثر در درمان و پیشگیری از چاقی، هنوز نیازمند مطالعه‌های بیش‌تری است. با توجه به تأثیرات مثبت ورزش و فعالیت بدنی بر روی ترکیب بدنی انعطاف پذیری به معرفی یکی از شکل‌های جدید ورزش ذهنی-بدنی به نام ورزش پیلاتس می‌پردازیم که در آن تمرکز بر روی کنترل حرکات، وضعیت قرارگیری بدن و تنفس است. پیلاتس (کنترولوژی) به معنای ایجاد هماهنگی کامل بین جسم، ذهن و روح است. در پیلاتس فرد در ابتدا از طریق کنترولوژی به شیوه هدفمند، کنترل کامل جسم خود را در دست می‌گیرند و سپس از طریق تکرار کامل حرکات به شیوه ای تدریجی ولی پیشرفت کننده به یک نوع هماهنگی طبیعی دست پیدا می‌کند. این روش توسط پزشکان به عنوان یک روش منحصر به فرد از آمادگی جسمانی که در آن ترکیبی از تقویت، کشش تنفس عضلانی به منظور توسعه عضلات تنه و بازگرداندن تعادل عضله استفاده می‌شود؛ شناخته شده است (۱۱) و برخلاف ورزشهای مقاومتی سستی که در آن عضلات به صورت جداگانه تمرین داده می‌شود، با یک رویکرد کل نگر نیازمند فعال سازی و هماهنگی چندین گروه عضله در یک زمان است. گرچه مطالعات اخیر گزارش کرده‌اند که ورزش پیلاتس برای تمام سنین، تمام تیپهای بدنی و آمادگی‌های بدنی مختلف مناسب است ولی محققان برای ترسیم نتایج ورزش پیلاتس روی عوامل آمادگی جسمانی و چاقی نیازمند تحقیقات بیشتری هستند (۱۲). تمرینات پیلاتس تنها شامل یک سری حرکات ثابت و کسل کننده نیست و به علت تنوع و ماهیت آن، تمایل افراد به ویژه زنان به آن بیشتر است. تمرینات پیلاتس جدید نه اصل دارد که شامل: تمرکز، آگاهی، راستای بدن، تنفس، تمرکز بر مرکز بدن، دقت، هماهنگی، کشش و تداوم است. ورزش پیلاتس روشی مناسب برای تعیین آگاهی ذهن - بدن و کنترل حرکات پوسچرال با درخواست‌های عصبی - عضلانی بالاست (۱۳). در تحقیق Omid Ali و همکاران دریافتند که انجام تمرینات پیلاتس به مدت ۸ هفته می‌تواند باعث کاهش درصد چربی، توده چربی و محیط کمر شود (۱۴). در تحقیق دیگر Khirandesh و همکاران اثر هشت هفته تمرین پیلاتس را بر سطوح

سپس، آزمودنی‌ها در آزمایشگاه تشخیص طبی حاضر شدند. دما و ساعت آزمون ثبت شد تا در مرحله بعدی نیز این شرایط حفظ گردد. از سیاهرگ دست راست هر آزمودنی در وضعیت نشسته و در حال استراحت، ۱۰ میلی لیتر خون گرفته شد. آنگاه نمونه خونی با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلاسما حاصل در یخچال در دمای ۴۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد تا در زمان لازم برای تشخیص آیریزین پلاسمایی به صورت کمی با روش الایزا استفاده شود. روش آماری: پس از جمع آوری داده‌ها از آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد. از آزمون کولموگروف - اسمیرنف جهت تعیین توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد. همچنین از آزمون آماری تی همبسته برای بررسی اختلاف معناداری میانگین‌های درون گروهی و از آزمون آماری تی مستقل نیز برای بررسی اختلاف معناداری میانگین‌های بین گروه کنترل و تجربی استفاده شد. همه‌ی نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده‌اند و مقادیر $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد. کلیه داده‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS ۲۲ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

متناسب با هدف پژوهش که بررسی اثر ۸ هفته تمرین پیلاتس بر آیریزین پلاسما و برخی شاخص‌های آنترپومتریکی زنان دارای اضافه وزن بود، آزمودنی‌هایی با شاخص توده بدنی ۲۵-۳۰ کیلوگرم برمقدور متر، دامنه سنی ۲۰-۳۰ سال و میانگین قد ۱۶۲ سانتی متر انتخاب شدند. با توجه به داده‌های جدول شماره ۱ نتایج آزمون تی همبسته برای متغیر آیریزین پلاسما در گروه تجربی قبل از اجرای پروتکل تمرینی با میانگین 12.79 ± 2.02 نانوگرم بر میلی لیتر بعد از هشت هفته تمرین پیلاتس به 20.30 ± 2.42 نانوگرم بر میلی لیتر رسید که این مقدار باتوجه به مقدار $p = 0.00$ و $t = 17.52$ از نظر آماری معنی‌دار شد. همچنین نتایج اختلاف درون گروهی از مومن تی همبسته برای شاخص‌های آنترپومتریک اندازه‌گیری شده در گروه تجربی (محیط بازو، محیط شکم، محیط لگن، محیط ران، وزن و شاخص توده بدنی) بعد از هشت هفته تمرین پیلاتس از نظر آماری معنی‌دار شد ($p < 0.05$). در متغیرهای اندازه‌گیری شده در گروه کنترل بعد از گذشت هشت هفته نسبت به ابتدای پژوهش تغییری حاصل نشد ($p > 0.05$). میانگین آیریزین پلاسما، بعد از هشت هفته تمرین پیلاتس براساس آزمون آماری تی مستقل که برای مقایسه میانگین بین گروهی بکار گرفته شد، اختلاف معناداری مشاهده شد ($p = 0.00$, $t = 5.156$). همچنین با وجود اینکه در متغیرهای آنترپومتریک کاهش معنی‌داری نسبت به قبل از تمرین در گروه تمرینی مشاهده شد، اما این بهبود نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

شروع اجرای این طرح. پس از غربالگری بر مبنای معیارهای فوق، ۲۰ نفر اجازه ورود به این مطالعه را گرفتند. بعد از توضیح طرح تحقیق و پر کردن فرم پرسشنامه آمادگی برای فعالیت بدنی (PAR-Q)، پرسشنامه وضعیت تندرستی و رضایت نامه شرکت و همکاری در تحقیق، افراد در یکی از دو گروه تجربی و کنترل به صورت تصادفی ساده تقسیم شدند. به همه‌ی آزمودنی‌ها آگاهی‌های لازم ارائه شد. به شرکت‌کنندگان در گروه تجربی مطالعه، توصیه شد که برنامه غذایی خود را ادامه دهند و برای کنترل تغذیه یادآمد خوراک دادیم. به علاوه به آزمودنی‌های گروه کنترل نیز توصیه شد که همان سبک زندگی قبلی خود را تا پایان کار تحقیقی ادامه دهند. امروزه روش‌های متعددی برای سنجش بافت چربی وجود دارد که برخی پیچیده و گران‌قیمت هستند و در پروژه‌های پژوهشی آزمایشگاهی به کار می‌روند و امکان استفاده از آن‌ها در پروژه‌های پژوهشی میدانی و جمعیت‌های بزرگ نیست؛ از طرفی روش‌های ساده‌تری مانند چین پوستی و اندازه‌گیری محیط و ابعاد اندام‌ها وجود دارد که دقت زیادی دارند و به سادگی قابل اجرا می‌باشند (۲۰). در تحقیق حاضر قبل از اعمال پروتکل تمرینی فاکتورهای مورد نظر از قبیل آزمایش خون، شاخص‌های آنترپومتریک چاقی شامل وزن بدن، BMI، دور کمر، دور لگن، دور ران و دور بازو قبل و بعد از انجام مداخله در هر دو گروه اندازه‌گیری شد. سپس آزمودنی‌ها به دو گروه (N=۱۰) تمرین پیلاتس و کنترل تقسیم شدند. در این تحقیق از پروتکل تمرینی استوت استفاده شد که در آن از پنج حرکت برای گرم کردن (تنفسی، چرخش کمر، کشش گربه، جمع کردن پاها به سینه در حالت درازکش، چرخش بازو و بالا بردن کف‌ها)، ده حرکت تقویتی شامل تقویت عضلات شکمی و باز کننده‌های ران (اسپاین استرچ، رول بک، اسپاین تویست، سینگل لگ استرچ، دابل لگ استرچ، سینگل لگ کیک، حرکت سا، ساید کیک سریز، لگ پول فرونت، لگ پول بک) و ده حرکت کششی شامل کشش عضلات خم کننده ران و ناحیه کمر (سویمنگ، هاندرد لگ سیر کل، شولدر بریج، سیزورز، کروک اسکرو، تیزر، هیپ توریست، رول اور، رول آپ) استفاده شده است، که عضلات تنه (عرضی شکم، مایل داخلی و خارجی، دیافراگم، مربع کمری، سوئز خاصره‌ای، بازکننده‌های عمقی ستون فقرات، سربینی‌ها) را درگیر می‌کرد و در سه وضعیت ایستاده، نشسته، خوابیده انجام شد (۱۷). آزمودنی‌ها به مدت هشت هفته/ سه جلسه در هفته، تحت شرایط تمرین قرار گرفت. برای بررسی متغیر آیریزین، عمل خون گیری بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی قبل از شروع پروتکل تمرینی و در پایان پروتکل تمرینی بعد از ۴۸ ساعت استراحت و حالت ناشتایی در دو مرحله، یعنی پیش از شروع تمرینات پیلاتس و بعد از هشت هفته تمرین، صورت گرفت. در مرحله اول، برای انجام خون گیری، از همه‌ی آزمودنی‌ها خواسته شد تا دو روز قبل از آزمون، هیچ فعالیت جسمی سخت انجام ندهند.

جدول ۱: نتایج آزمون t همبسته و مستقل آیریزین پلاسما و شاخص‌های آنتروپومتریک در زنان دارای اضافه وزن برای دو گروه کنترل و تجربی

متغیر	گروه	قبل تمرینات M±SD	بعد تمرینات M±SD	نتایج آزمون تی همبسته (اختلاف درون گروهی)	نتایج آزمون تی مستقل بعد از ۸ هفته تمرین پیلاتس
				مقدار p	مقدار t
آیریزین	گروه کنترل	۱۵/۱۸±۱/۸۹	۱۵/۰۷±۲/۱۰	۰/۴۵۹	۰/۸۷۴
(نانوگرم/میلی‌لیتر)	گروه تجربی	۱۲/۷۹±۲/۰۲	۲۰/۳۰±۲/۴۲	۰/۰۰۰*	-۱۷/۵۲۳
محیط بازو	گروه کنترل	۲۹/۸۰±۳/۳۵	۳۰/۱۰±۳/۶۳	۰/۲۷۹	-۱/۱۵۲
(سانتی‌متر)	گروه تجربی	۳۳/۸۰±۳/۳۹	۳۲/۳۰±۳/۴۶	۰/۰۰۷*	۳/۵۰۳
محیط کمر	گروه کنترل	۸۷/۲۰±۸/۷۷	۸۷±۸/۸۰	۰/۶۷۸	۰/۴۲۹
(سانتی‌متر)	گروه تجربی	۹۶/۹۰±۱۰/۹۱	۹۰/۴۰±۱۰/۱۰	۰/۰۰۰*	۵/۳۱۲
محیط لگن	گروه کنترل	۹۲/۲۰±۲۰/۶۱	۹۲/۵۰±۲۰/۵۲	۰/۲۷۹	-۱/۱۵۲
(سانتی‌متر)	گروه تجربی	۱۰۵/۲۰±۸/۱۸	۱۰۲/۷۰±۷/۳۷	۰/۰۱۳*	۳/۱۰۱
محیط ران	گروه کنترل	۶۵/۵۰±۱۴/۰۲	۶۵/۸۰±۱۴/۰۱	۰/۱۹۳	-۱/۴۰۶
(سانتی‌متر)	گروه تجربی	۶۲/۸۰±۵/۱۵	۶۰/۶۰±۴/۳۲	۰/۰۰۵*	۳/۷۱۳
وزن	گروه کنترل	۶۴/۴۳±۷/۰۹	۶۴/۴۸±۶/۹۸	۰/۸۲۵	-۰/۲۲۸
(کیلوگرم)	گروه تجربی	۷۲/۱۷±۸/۸۹	۷۰/۳۴±۹/۴۳	۰/۰۰۳*	۳/۹۶۷
شاخص توده بدن	گروه کنترل	۲۵/۲۷±۲/۶۳	۲۵/۱۷±۲/۷۶	۰/۴۷۹	۰/۸۳۸
(کیلوگرم بر مجذور متر)	گروه تجربی	۲۸/۱۳±۴/۰۲	۲۷/۳۳±۴/۱۳	۰/۰۰۲*	۴/۲۶۸

*علامت معنی‌داری در ۰/۰۵ < p است.

بحث

(۲۲). در گذشته تصور بر این بود که بافت چربی قهوه‌ای در بدن انسان بالغ وجود ندارد، اما مطالعات جدید حاکی از وجود این بافت و عملکرد مفید آن در بدن انسان است. در حقیقت برخلاف عمل ذخیره‌سازی که ویژه بافت چربی سفید است، بافت چربی قهوه‌ای به خاطر بیان پروتئین جفت نشده‌ی ۱ و افزایش تراکم میتوکندریایی، نقش گرم‌زایی (تبدیل انرژی شیمیایی به انرژی حرارتی) را ایفا می‌کند (۲۳). به علاوه، سطوح بالای بافت چربی قهوه‌ای با مقاومت در مقابل بیماری‌های متابولیک مرتبط است (۲۴). با توجه به تحقیقات Van و همکاران که نشان دادند مقدار بافت قهوه‌ای در افراد چاق نسبت به افراد گروه شاهد کمتر بود این بدان معنی است که بین بافت چربی قهوه‌ای و شاخص توده بدنی و درصد چربی در افراد غیرفعال، ارتباط منفی وجود دارد. به هر حال، ساز و کار مؤثر در تغییر بافت چربی تا حد زیادی ناشناخته است (۲۵). یکی از مطالعات جذابی که در سالهای اخیر توسط Bostrom و همکاران انجام شده است، پرده از یک مکانیسم مولکولی جدید برمی‌دارد که بر مبنای آن، اثر تبدیلی بافت چربی سفید به قهوه‌ای و افزایش گرم‌زایی و در نهایت، کاهش وزن نشان داده شده است. تئوری این گروه از دانشمندان، حاکی از شناسایی مایوگین جدیدی است که توسط PGC-1 القا می‌شود (۲۴). این متغیر یک عامل فعال‌کننده‌ی عامل رونویسی فعال‌کننده‌ی PPAR- γ است که بسیاری از اثرات بیولوژیک خود را بر متابولیسم انرژی اعمال می‌کند. محققان (۲۶) نشان دادند که در اثر تمرین، PGC-1 بیان می‌شود و موجب تحریک بسیاری از فرایندهایی مانند بیوژنز میتوکندریایی، آنژیوژنز، تغییر نوع تار

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر هشت هفته تمرین پیلاتس بر آیریزین پلاسما و شاخص‌های آنتروپومتریک انجام شد تا راهکاری برای تناسب اندام و سلامتی ارائه دهد. نتایج تی همبسته نشان داد، در تحقیق حاضر تمرین پیلاتس باعث کاهش معنادار شاخص‌های آنتروپومتریک زنان دارای اضافه وزن گردید. همچنین متغیر آیریزین که مهمترین شاخص مورد بررسی این پژوهش بود بعد از هشت هفته تمرین پیلاتس، افزایش معنی‌داری در گروه تجربی داشت. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق Seraj و همکاران با عنوان تاثیر تمرینات پیلاتس بر روی ترکیب بدنی و انعطاف‌پذیری زنان غیرورزشکار، همسو می‌باشد. در این تحقیق گروه تجربی به مدت ۸ هفته تمرینات پیلاتس زیر نظر مربی انجام دادند. نتایج تحقیق نشان داد یک دوره تمرینات پیلاتس بر درصد چربی و شاخص توده بدنی زنان غیرورزشکار تأثیر معنی‌داری دارد (۱۱)؛ همچنین Omid Ali و همکاران در تحقیقی دریافتند که انجام تمرینات پیلاتس به مدت ۸ هفته، ۳ جلسه در هفته و هر جلسه یک ساعت، می‌تواند باعث کاهش درصد چربی، توده چربی و محیط کمر شود و این نتایج با تحقیق حاضر همسو می‌باشد (۱۴). همچنین افزایش معنادار آیریزین در این تحقیق با کار تحقیقی خدادادی و همکاران که روی زنان جوان دارای اضافه وزن با پروتکل تمرین تناوبی شدید و پیلاتس انجام دادند همسو بود. دلایل افزایش آیریزین در اثر تمرینات تناوبی شدید و پیلاتس را باید در سیگنال‌های فعال‌کننده PGC1a جستجو کرد. بنابراین عواملی که می‌توانند موجب فعال‌سازی PGC1a گردند، به احتمال زیاد بتوانند سبب آبخار پیام‌دهی تغییر فنوتیپ بافت چربی شوند

تمرین تناوبی با شدت بالا و حجم پایین بر میزان استراحتی آیریزین و میزان آیریزین پلاسما پس از یک وهله فعالیت استقامتی زیربیشینه در مردان جوان انجام دادند همسو با نتایج تحقیق حاضر است. یافته‌های Jabari و همکاران این مطلب را بیان می‌کنند که تمریناتی مثل استقامتی زیر بیشینه شاید شروع روند ترشح آبشار آیریزین پلاسما باشند که تمرینات پیلاتس در تحقیق حاضر نیز با توجه به شباهتی که به تمرینات استقامتی زیربیشینه از نظر شدت، مدت و زمان درگیری عضلات بدن دارند می‌توانند شروع کننده روند آبشاری ترشح آیریزین باشند؛ از اثرات احتمالی تمرین، تبدیل بافت چربی سفید به چربی قهوه‌ای است. این بدان معناست که تمرین، میزان نسبی بافت چربی قهوه‌ای را افزایش می‌دهد (۱۷).

نتیجه‌گیری

بطور کلی براساس نتایج بدست‌آمده از تحقیق، تمرینات پیلاتس ارائه شده در تحقیق حاضر مداخلات کارآمد و مؤثری برای کاهش شاخص‌های آنروپومتریکی چاقی و افزایش هورمون آیریزین افراد فراهم می‌کند؛ با وجود این، مطالعات گسترده‌تری در سایر گروه‌های سنی و تأثیر رژیم غذایی به پژوهشگران توصیه می‌شود.

قدردانی

بدینوسیله محققان بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاسگزاری خود را از مسئولان محترم باشگاه ورزشی آروشای خرم آباد به جهت همکاری در نمونه‌گیری و اجرای پژوهش و تمامی افرادی که ما را در امر یاری نمودند، به عمل آورند. این مقاله برگرفته از یک کار پژوهشی می‌باشد و با رضایت کامل افراد آزمودنی به انجام رسیده است.

منابع مالی

منابع مالی این طرح تحقیقاتی بصورت آزاد و بعهده نویسندگان بوده است.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

ا، خ، م ک و همکاران، طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند، همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

عضلانی و جلوگیری از آتروفی عضلانی می‌گردد (۲۷). بهرحال اثرات مفید ناشی از افزایش بیان ژن PGC-1 ممکن است خارج از بافت عضلانی نیز باشد، زیرا این عامل، موجب بیان ژن UCP1 و گرم‌سازی در بافت چربی قهوه‌ای می‌گردد (۲۲). PGC-1 موجب تحریک ترشح موادی از عضله اسکلتی می‌گردد که بر عملکرد سایر بافت‌ها تأثیرگذار است. یکی از مهمترین این مواد FNDC5 است (۲۶). این پروتئین پس از شکستن در خون ترشح می‌شود که هورمون آیریزین نامگذاری شده است. آیریزین در بافت چربی قهوه‌ای موجب بیان ژن UCP1 می‌گردد (۲۳). بطور خلاصه، این تئوری بیان می‌کند که در اثر تمرین، از عضله اسکلتی هورمونی به نام آیریزین ترشح می‌شود که با تأثیر بر بافت چربی سفید و قهوه‌ای، باعث افزایش انرژی مصرفی و در نهایت کاهش وزن می‌گردد. Stella و همکاران مطالعه‌ای با عنوان افزایش پیش رونده سطح آیریزین پلاسما در پاسخ به افزایش بار تمرین در آزمودنی‌های جوان، سالم و فعال انجام دادند (۲۸). Norheim و همکاران (۲۰۱۴) اثرات ورزش حاد و مزمن را در PGC-1a، آیریزین و بافت چربی قهوه‌ای زیر جلدی در مردان دیابتی مورد بررسی قرار دادند. مقدار آیریزین بلافاصله پس از تمرین افزایش ۲ ساعت پس از تمرین کاهش یافت که با نتایج تحقیق حاضر از نظر کاهش ۲ ساعت پس از تمرین ناهمسو است زیرا در مطالعه حاضر خون-گیری از آزمودنی‌ها ۴۸ ساعت پس از تمرین انجام شد. دلیل ناهمخوانی می‌تواند نوع تمرین استفاده شده یا جنسیت آزمودنی‌ها، نوع تغذیه، کیت‌های الایزا و آنتی بادی‌های متفاوت باشد. لازم به ذکر است که نورهیم و همکاران دلیل ناهمخوانی نتیجه تحقیق را با تحقیقاتی که روی موش انجام شده تفاوت کدون شروع بیان ژن در انسان (ATA) و موش (ATG) بیان کردند (۲۹). مشابه با تحقیق نورهیم و همکاران و ناهمسو با مطالعه حاضر کرامر و همکاران تحقیقی با عنوان افزایش ناپایدار غلظت آیریزین خون در پاسخ به تمرین طولانی مدت و متوسط هوازی در زنان و مردان انجام دادند که نتایج نشان داد غلظت آیریزین پس از گذشت ۵۴ دقیقه از تمرین بالاتر بود و پس از گذشت ۹۰ دقیقه از تمرین غلظت بالایی نداشت Moienneia و همکاران به مقایسه اثر یک دوره برنامه تمرین مقاومتی با شدت‌های مختلف بر سطوح سرمی آیریزین زنان جوان غیر فعال پرداختند و نتایج نشان داد یک دوره تمرین مقاومتی با شدت‌های کم و زیاد نمی‌تواند سبب افزایش سطوح آیریزین در زنان جوان غیر فعال شود با نتایج حاضر همسو نبود (۱۶)؛ که دلیل این ناهمخوانی می‌تواند شدت تمرین باشد و همچنین تفاوت در سن، وزن و نوع تغذیه آزمودنی‌ها می‌تواند از دلایل دیگر باشد. تحقیق جباری و همکاران که تأثیر یک جلسه فعالیت استقامتی زیر بیشینه بر میزان آیریزین پلاسما و چهار هفته

References

- Barry Braun, Carrie Sharoff, Stuart R. Chipkin, Francesca Beaudoin. *Effects of insulin resistance on substrate utilization during exercise in overweight women. Journal of Applied Physiology* 2004; **97**(3): 991-997 doi: 10.1152/japp lphysiol.00231.2004
- Khosravi A. *effects of low intensity resistance trainings on anthropometric indices in overweight women. Thesis. Journal of Physiology and Management in Sports* 2015; **7**(4): 33-43. (Persian)
- Steinbeck K S. The importance of physical activity in the prevention of overweight and obesity in childhood: a review and an opinion. *Obesity reviews* 2001; **2**: 117-130. doi: 10.1046/j.1467-789x.2001.00033.x.
- Chung J-Y, Kang H-T, Lee D-C, Lee H-R, Lee Y-J. Body composition and its association with cardio metabolic risk factors in the elderly: a focus on sarcopenia obesity. *Archives of gerontology and geriatrics* 2013; **56**(1): 270-278. doi: 10.1016/j.archger.2012.09.007.
- Tseng L A, Delmonico M J, Visser M, Boudreau R M, Goodpaster B H, Schwartz A V, et al. Body composition explains sex differential in physical performance among older adults. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2014; **69**(1): 93-100. doi: 10.1093/gerona/glt027
- Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. *New England Journal of Medicine* 2010; **362**(12): 1090-1101.
- Swick A G, Orena S, O'Connor A. Irisin levels correlate with energy expenditure in a subgroup of humans with energy expenditure greater than predicted by fat free mass. *Metabolism* 2013; **62**(8): 1070-1073. doi: 10.1016/j.metabol.2013.02.012
- Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development , function and therapeutic potential. *Nature Medicine* 2013; **19**(10): 1252-1263. doi: 10.1038/nm.3361
- Miyamoto K, Mori S, Tsuji S, Tanaka S, Kawamo M, Mashiba T, et al. editors. *Whole-body vibration exercise in the elderly people*. BONE; ELSEVIER SCIENCE INC 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK.2003, NY 10010-1710 USA.
- Sadati M. *The effect of whole body vibration training. aerobic and combined exercise on body composition in obese middle-aged women non-athlete/ overweight.thesis.2012.(Persian)*
- Seraj I, Asad M, Farahani A, Azrfy A. The Effect of Pilates Exercises on the lumbar athletes. *Journal of Medical Sciences University Ilam* 2013; **21**: 8. (Persian).
- Khodadadi H, Rajabi H, Attarzadeh S R, Abbasian S. The effect of high intensity interval training (hiit) and pilates on levels of irisin and insulin resistance in overweight women. *Ranian J Endocrinol Metabol* 2014; **16**(3): 190-226.
- Rajabi R, Usebashi L, Tkamjany Brahimi E. Effects of pilates training on the hyper lordosis lumbar non-athletic women. *Research in Sports Sciences* 2012; **8**. (Persian).
- Omid Ali Z, Taheri H, Esfarjani F, Bambychy E, Marandi, SM. Effect of Pilates on some physiological factors and lumbar Ghyrvrzhkardaray overweight women, research in rehabilitation sciences 2011; **8**. (Persian).
- Khirandish R. The effect of eight weeks pilates training on serum irisin levels and insulin resistance index in obese women, Thesis. *Chamran University*. 2016. (Persian).
- Moienneia N, Attarzadeh Hosseini S R. comparison of the effect of resistance training program with different intensities on serum irisin levels in sedentary young women. *Exercise physiology* 2016; **26**: 142-127. (Persian).
- Jabari M. *The effect of submaximal endurance exercise on plasma irisin and four weeks of high intensity interval and volume down on irisin resting and submaximal endurance exercise after a plasma irisin in young men*. 2011. (Persian).
- Miyamoto-Mikami E, Sato K, Kurihara T, Hasegawa N, Fujie S, Fujita S, et al. Endurance training-induced increase in circulating irisin levels is associated with reduction of abdominal visceral fat in middle-aged and older adults. *PloS one* 2015; **10**(3): 12-19.
- Tsuchiya Y, Ando D, Takamatsu K, Goto K. *Resistance exercise induces a greater irisin response than endurance exercise. Metabolism* 2015; **64**(9): 1042-1050. doi: 10.1016/j.metabol.2015.05.010.
- Taylor J W, Keil D, Gold E. J "Body massindex, waist girth and waist to hip ratio as indexes of total and regional adiposity in women: evaluation using receiver operating characteristics curves" *J Clin Nutr* 2000; **67**: 44-53.
- Khirandish R. The effect of eight weeks pilates training on serum irisin levels and insulin resistance index in obese women, Thesis. *Chamran University* 2016. (Persian).
- Khodadadi H, Rajabi h, Attarzadeh S R. The Effects of High Intensity Interval Training (HIIT) and Pilates on levels of Irisin and insulin Resistance in overweight women". *Journal of Endocrinology and Metabolism, martyr Beheshti University of Medical Sciences* 2015; **3**: 190-196. (Persian).
- Handschin C, Spiegelman B M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature* 2008; **454**(7203): 463-469. doi: 10.1038/nature07206.

24. Boström P, Wu J, Jedrychowski M P, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A *PGC1- α* -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis 2012; **481**(7382): 463-468. doi: 10.1038/nature10777.
25. van Marken Lichtenbelt W D, Vanhommerig J W, Smulders N M, Drossaerts J M, Kemerink G J, Bouvy N D, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009; **360**(15): 1500-1508. doi: 10.1056/NEJMoa0808718.
26. Wenz T, Rossi S G, Rotundo R L, Spiegelman B M, Moraes C T. Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(48): 20405-20410. doi: 10.1073/pnas.0911570106.
27. Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; **300**(5): R1115-R1125. doi: 10.1152/ajpregu.00806.
28. Norheim F, Langleite T M, Hjorth M, Holen T, Kielland A, Stadheim H K, et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 α , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. *FEBS Journal* 2014; **281**(3): 739-749. doi: 10.1111/febs.12619.
29. Stella S Daskalopoulou, Alexandra B Cooke, Yessica-Haydee Gomez. Plasma irisin levels progressively increase in response to increasing exercise workloads in young, healthy, active subjects. *European Journal of Endocrinology* 2014. doi: 10.1530/EJE-14-0204.

Original Article

Effect of 12 weeks aerobic and combined trainings on neural conduction in type 2 diabetes men with peripheral neuropathy

Saeid Dabbagh Nikookheslat¹, Vahid SariSarraf¹, Yaghoob Salekzamani², Masoud Abdollahpour Alni^{3*}

¹Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

²Department of Physical Medicine and Rehabilitation, School of Physical Medicine and Rehabilitation, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³PhD in Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: masoudsport326@yahoo.com

Received: 7 May 2017 Accepted: 5 July 2017 First Published online: 20 May 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):47-55

Abstract

Background: Diabetes is one of the most common metabolic disorders that are rapidly expanding worldwide . The aim of this study was to investigate the effect of 12 weeks aerobic and combined training on neural conduction in type 2 diabetes men with peripheral neuropathy.

Methods: twenty-two male with type 2 diabetes were randomly divided into two groups of aerobic (11) and combined (11). Intensity of aerobic exercise was 70 to 75 percent of maximum heart rate for 25 to 45 minutes and combined training consists of both aerobic and resistance training, three times a week for 12 weeks. Before and after intervention, nerve conduction measurements and blood samples were done. The collected data were analyzed using independent-T test and paired samples-T test.

Results: In both groups sural, peroneal and tibial nerve conduction velocity (NCV), and sural and peroneal nerve action potential amplitude significantly increased ($P<0.05$), However tibial motor nerve action potential amplitude was significantly increased only in combined group ($P<0.05$). In addition, there was significantly differences between two groups in variation range of peroneal and tibial motor nerve action potential amplitude ($P<0.05$).

Conclusion: Both aerobic and combined training in control of diabetes are effectiveness, but it seems NCV and nerve action potential amplitude improves in combined training more than aerobic training.

Keyword: Aerobic and combined trainings, Type 2 diabetes, Nerve conduction velocity, Peripheral neuropathy.

How to cite this article: Dabbagh Nikookheslat S, SariSarraf V, Salekzamani Y, Abdollahpour Alni M. [Effect of 12 weeks aerobic and combined trainings on neural conduction in type 2 diabetes men with peripheral neuropathy]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):47-55. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و ترکیبی بر هدایت عصبی مردان دیابتی نوع دو مبتلا به نوروپاتی محیطی

سعید دباغ نیکو خصلت^۱، وحید ساری صراف^۱، یعقوب سالک زمانی^۲، مسعود عبدالله پور آلنی^{۳*}

^۱گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
^۲گروه طب فیزیکی و توانبخشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
^۳دکترای فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
نویسنده مسئول: ایمیل: masoudsport326@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱۴ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۴۷-۵۵

چکیده

زمینه: دیابت یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیکی است که شیوع آن در جهان به سرعت در حال گسترش است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و ترکیبی بر هدایت عصبی مردان دیابتی نوع دو مبتلا به نوروپاتی محیطی بود.

روش کار: بیست و دو مرد دیابتی نوع دو به طور مساوی به دو گروه هوازی (۱۱) و ترکیبی (۱۱) تقسیم شدند. تمرین هوازی با شدت ۷۰ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه به مدت ۲۵ تا ۴۵ دقیقه و تمرین ترکیبی شامل تمرینات هوازی و مقاومتی، سه جلسه در هفته و به مدت ۱۲ هفته بود. قبل و بعد از مداخله، اندازه‌گیری‌های هدایت عصبی و خونگیری صورت گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های T وابسته و مستقل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها: در هر دو گروه افزایش معنی‌داری در سرعت هدایت عصب سورا، پروئال و تیپال و همچنین افزایش معنی‌داری در آمپلی‌تود پتانسیل عمل عصب سورا و پروئال مشاهده گردید ($P < 0.05$)، با این حال آمپلی‌تود پتانسیل عمل عصب تیپال فقط در گروه ترکیبی افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). علاوه بر این، بین دو گروه در دامنه تغییرات آمپلی‌تود پتانسیل عمل عصب پروئال و تیپال تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: هر دو تمرین هوازی و ترکیبی روش‌های مؤثری در کنترل دیابت نوع دو محسوب می‌شوند، ولی به نظر می‌رسد سرعت هدایت عصبی و آمپلی‌تود پتانسیل عمل عصب در تمرین ترکیبی نسبت به تمرین هوازی بهبود بیشتری را نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: تمرین هوازی و ترکیبی، دیابت نوع دو، سرعت هدایت عصبی، نوروپاتی محیطی

نحوه استناد به این مقاله: دباغ نیکو خصلت س، ساری صراف و، سالک زمانی ی، عبدالله پور آلنی م. تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و ترکیبی بر هدایت عصبی مردان دیابتی نوع دو مبتلا به نوروپاتی محیطی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۱(۲): ۴۷-۵۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیکی است که شیوع آن در جهان به سرعت در حال گسترش می‌باشد و تخمین زده می‌شود شمار افراد مبتلا به دیابت در جهان از ۳۸۲ میلیون نفر در سال ۲۰۱۳ به ۵۹۲ میلیون نفر در سال ۲۰۳۵ افزایش یابد. دیابت به دو نوع دیابت نوع یک و نوع دو طبقه‌بندی می‌شود که دیابت نوع دو شایع‌ترین آن می‌باشد (۱). سالیانه بیش از ۲۵۰ هزار نفر از مشکلات ناشی از بیماری دیابت می‌میرند و دو برابر این تعداد نیز در خطر بروز حملات قلبی و سکته قرار دارند (۲). میزان شیوع دیابت در ایران در سال‌های ۱۹۹۵، ۲۰۰۰ و ۲۰۲۵ به ترتیب برابر با ۵/۵، ۵/۷ و ۶/۸ درصد برآورد شده است که نشان می‌دهد در حال حاضر حدود پنج میلیون نفر دیابتی در ایران وجود دارد (۳). عوامل متعددی همانند چاقی، سبک زندگی غیر فعال، غذاهای پرکالری و پیری زمینه‌ساز بیماری دیابت هستند (۴). همچنین عوامل محیطی و ژنتیکی، اختلال در کارکرد سلول‌های بتا و مقاومت انسولین در ایجاد دیابت نقش دارند (۵). در بیماری دیابت، سطح بالای قند خون و اختلالات متابولیکی منجر به عوارض متعددی از جمله افزایش فشارخون و چربی خون، اختلالات کلیوی و بینایی، مشکلات انعقادی، اختلال در عملکرد اعصاب و بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود. همچنین، دیابت می‌تواند منجر به اختلالات نورولوژیک شود که بخش‌های مختلف سیستم عصبی اعم از اعصاب محیطی و اعصاب اتونوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نوروپاتی محیطی دیابتی از جمله عوارض عصبی دیابت است که ممکن است در طی سال‌ها پس از شروع بیماری ظاهر شود (۶). نوروپاتی موجب ناتوانی و پیامدهای قابل توجهی از جمله درد شدید، کاهش و فقدان حس، افزایش خطر ایجاد زخم و آمپوتاسیون، افزایش بی‌ثباتی و اختلال کنترل وضعیت در بیمار می‌شوند که علت اصلی این اختلالات، کاهش عملکرد حس عمقی سیستم حسی پیکری می‌باشد (۷).

در افراد دیابتی نوع دو معمولاً جابجایی GLUT4 از عمق به سطح سلول، که توسط انسولین تحریک می‌شود، مختل می‌باشد. در این راستا، تحقیقات نشان داده‌اند که در اثر تکرار فعالیت ورزشی، بیان ناقل GLUT4 افزایش یافته و میزان کلی آن در سطح سلول‌های عضلانی بیشتر می‌شود که در نهایت منجر به افزایش حساسیت سلول‌های عضلانی به انسولین، بهبود عمل انسولین و کاهش سطح قند خون به مقادیر طبیعی می‌گردد (۸). نشان داده شده است که با افزایش فعالیت ورزشی و در نتیجه افزایش کنترل قند خون، آسیب به اعصاب کاهش یافته و می‌تواند منجر به کاهش عوارض ناشی از نوروپاتی حسی حرکتی شود که در اثر تخریب سلول‌های عصبی رخ می‌دهد (۹). تمرین استقامتی با افزایش عملکرد قلبی عروقی، افزایش ظرفیت هوازی و تغییر در نسبت تارهای عضلانی همراه بوده و واحدهای حرکتی در این تمرین به

طور متناوب فعال و درگیر می‌شوند. از سوی دیگر تمرین قدرتی با افزایش تولید نیرو، هیپرتروفی عضلانی، به ویژه در تارهای تند انقباض، فراخوانی تعداد زیاد واحد حرکتی و تکانش‌های عصبی همراه است (۱۰). همچنین تمرین مقاومتی می‌تواند حجم، قدرت و توان عضله را بهبود بخشیده و به عنوان یک ابزار درمانی سالم در نظر گرفته شود. تمرین مقاومتی می‌تواند حساسیت انسولین و مصرف روزانه انرژی را افزایش داده و کیفیت زندگی را بهبود بخشد (۱۱). از سوی دیگر، تمرین هوازی می‌تواند اثر انسولین را بر هر فیبر عضلانی بدون افزایش اندازه فیبر تغییر دهد که بیشتر بر سرعت هدایت عصبی مؤثر می‌باشد، در حالی که تمرین مقاومتی ترجیحاً جذب گلوکز را با افزایش اندازه هر فیبر عضلانی بهبود می‌بخشد که بیشتر بر آمپلیتود مؤثر می‌باشد. از این رو، تمرین ترکیبی می‌تواند اثرات مضاعف ناشی از مکانیسم‌های جبرانی هر دو نوع ورزش را اعمال کند و برای افراد دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی مؤثرتر واقع گردد (۱۲، ۱۳).

با این وجود، مطالعات اندکی وجود دارد که از تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی در مدیریت بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی استفاده کرده‌اند (۹). در تحقیق Gholami (۲۰۱۵)، ۱۲ هفته تمرین هوازی باعث افزایش معنی‌دار سرعت هدایت عصبی و عدم تغییر معنی‌دار در آمپلیتود پتانسیل عمل شده بود (۱۴). در تحقیق Kluding و همکاران (۲۰۱۲) نیز سرعت هدایت عصبی آمپلیتود پتانسیل عصب در اثر هشت هفته تمرین هوازی و قدرتی تغییر معنی‌داری نکرده بود (۹). مطالعات قبلی در زمینه دیابت بیشتر از تمرینات هوازی استفاده کرده‌اند و بنابراین سؤال اصلی تحقیق حاضر این است که تأثیر تمرین ترکیبی بر سازگاری‌های عصبی عضلانی چگونه است؟ آیا تمرین ترکیبی نسبت به تمرین هوازی تأثیر بیشتری بر این پارامترها دارد؟ با توجه به استفاده کاربردی و روزافزون علم تمرین در پیشگیری، ضروری به نظر می‌رسد تا تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و ترکیبی بر هدایت عصبی مردان دیابتی نوع ۲ مبتلا به نوروپاتی محیطی بررسی شود.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی و با طرح پیش‌آزمون-پس-آزمون می‌باشد. آزمودنی‌ها قبل از شرکت در آزمون‌ها فرم رضایت‌نامه شرکت در آزمون را تکمیل کردند. همچنین آزمودنی‌ها پس از تأیید کمیته اخلاقی با کد IR.TBZMED.REC.1395.966 در یک کلاس توجیهی مربوط به آزمون شرکت کرده و موضوع، اهداف و روش‌های تحقیق برای آنها شرح داده شد و به آنها اطمینان داده شد که قادر به قطع همکاری در هر مرحله از تحقیق هستند. جامعه آماری پژوهش حاضر را کلیه مردان دیابتی نوع دو مبتلا به نوروپاتی محیطی شهر تبریز با محدوده سنی ۳۵ تا ۶۵ سال

تشکیل دادند. در ابتدا با استفاده از بررسی پرونده پزشکی افراد، میزان سابقه بیماری آزمودنی‌ها، دامنه سنی ۳۵ تا ۶۵ سال، میزان فعالیت روزانه و عدم منع پزشکی جهت انجام فعالیت‌های ورزشی، ۴۰۰ نفر از مردان دیابتی مورد بررسی قرار گرفت. سپس ۷۰ نفر از این افراد با داشتن شرایط اولیه شامل سابقه دیابت بیش از پنج سال، عدم فعالیت ورزشی روزانه و $HbA1c$ بین ۶/۶ تا ۱۲ درصد انتخاب شدند و توسط متخصص طب فیزیکی و توانبخشی آزمایش الکترومیوگرافی از آزمودنی‌ها صورت گرفت. از بین این ۷۰ نفر، ۴۵ نفر مبتلا به نوروپاتی محیطی بودند و تست ورزشی را انجام دادند. از بین این افراد ۱۷ نفر به خاطر مشکل قلبی و عدم تمایل از تحقیق کنار گذاشته شدند. سپس ۲۸ نفر باقی مانده به دو گروه هوازی (۱۴ نفر) و ترکیبی (۱۴ نفر) برای شرکت در دوره سه ماهه تحقیق انتخاب شدند. یک هفته قبل از شروع تمرین اطلاعات پیکرسنجی آزمودنی‌ها به منظور همگن‌سازی گروه‌ها در آزمایشگاه اندازه‌گیری و ثبت شد. از میان این ۲۸ نفر، شش نفر به دلیل بیماری و تمرین نامنظم از تمرین کنار گذاشته شدند که تعداد آزمودنی‌ها در هر گروه ۱۱ نفر شدند. مشخصات عمومی آزمودنی‌ها (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد) در جدول ۱ آورده شده است. قبل از شروع تمرین خونگیری ناشتا و دو ساعته از آزمودنی‌ها گرفته شد. قبل از شروع پروتکل اصلی تحقیق، آزمودنی‌ها تمرین هوازی با شدت ۶۰ درصد ضربان قلب بیشینه به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و تمرین ترکیبی را سه جلسه در هفته به

مدت دو هفته به منظور آشنایی با تمرینات انجام دادند. پس از پایان دوره آشنایی، حداکثر اکسیژن مصرفی توسط دستگاه گاز آنالایزر مدل MetaLyzer 3B ساخت کشور آلمان و با تست بروس اصلاح شده روی نوارگردان تکنوجیم ساخت کشور ایتالیا سنجیده و تمرینات اصلی شروع شد. تمرین هوازی شامل سه جلسه تمرین در هفته و به مدت ۱۲ هفته بود. برنامه شامل ۱۵ دقیقه حرکات کششی و فعالیت سبک برای گرم کردن، فعالیت اصلی با شدت ۷۰ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه به مدت ۲۵ تا ۴۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه حرکات کششی برای سرد کردن بود. در ابتدای تمرینات، شدت تمرین ۷۰ درصد ضربان قلب بیشینه و مدت آن نیز ۲۵ دقیقه بود که با گذشت هفته‌های تمرینی هم شدت و هم مدت زمان تمرین افزوده شد. تمرین ترکیبی هم شامل هر دو تمرینات هوازی و مقاومتی بود که سه جلسه در هفته به مدت ۱۲ هفته انجام شد. در تمرین ترکیبی ابتدا تمرین هوازی (سه جلسه در هفته) انجام شد، سپس در همان روز و بلافاصله بعد از تمرین هوازی، تمرین مقاومتی (دو جلسه در هفته) اجرا شد که تعداد ست‌ها در تمرین مقاومتی یک ست بود (جدول ۲) (۱۵)، (۱۶). برای کنترل شدت تمرین هوازی از ضربان‌سنج پلار ساخت کشور فنلاند و همچنین میزان درک فشار بورگ استفاده شد. در پایان تمرینات دوباره از آزمودنی‌ها خونگیری ناشتا و دو ساعته به عمل آمد.

جدول ۱: مشخصات عمومی آزمودنی‌ها (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)

گروه	سن (سال)	قد (سانتی‌متر)	وزن (کیلوگرم)	چربی بدن (درصد)	سابقه دیابت (سال)	شاخص توده بدنی (kg/m^2)
هوازی (۱۱ نفر)	۵۵/۴ $\pm$ ۷/۵	۱۷۲/۷ $\pm$ ۷/۷	۸۸/۳ $\pm$ ۱۶/۸	۲۹/۶ $\pm$ ۵/۱	۱۳/۲ $\pm$ ۷/۳	۲۹/۴ $\pm$ ۳/۹
ترکیبی (۱۱ نفر)	۵۰/۴ $\pm$ ۸/۸	۱۷۰/۲ $\pm$ ۸/۱	۸۴/۸ $\pm$ ۱۴/۷	۳۰/۶ $\pm$ ۶/۷	۱۰/۱ $\pm$ ۴/۸	۲۹/۱ $\pm$ ۳/۷
کل (۲۲ نفر)	۵۲/۹ $\pm$ ۸/۴	۱۷۱/۴ $\pm$ ۷/۹	۸۶/۵ $\pm$ ۱۵/۵	۳۰/۱ $\pm$ ۵/۸	۱۱/۶ $\pm$ ۶/۲	۲۹/۳ $\pm$ ۳/۷

جدول ۲: پروتکل تمرینات ورزشی (سه جلسه در هفته)

گرم کردن (۲ هفته)						
هفته	مدت (دقیقه)	شدت (ضربان قلب بیشینه)	تمرین هوازی			
			مدت		شدت	
۱-۲	۱۵-۲۰	۶۰	هوازی (۳ جلسه)		تمرین ترکیبی	
			مدت	شدت	مقاومتی (۲ جلسه)	حداکثر تکرار
۱-۲	۱۵-۲۰	۶۰	۱۵-۲۰	۶۰	ست	تکرار
تمرین اصلی (۱۲ هفته)						
هفته	مدت (دقیقه)	شدت (ضربان قلب بیشینه)	تمرین هوازی			
			مدت		شدت	
۱-۲	۲۵	۷۰	هوازی (۳ جلسه)		تمرین ترکیبی	
			مدت	شدت	مقاومتی (۲ جلسه)	حداکثر تکرار
۱-۲	۲۵	۷۰	۲۵	۷۰	ست	تکرار
۳-۴	۳۰	۷۰	۳۰	۷۰	ست	تکرار
۵-۶	۳۵	۷۰	۳۵	۷۰	ست	تکرار
۷-۸	۴۰	۷۰	۴۰	۷۰	ست	تکرار
۹-۱۰	۴۵	۷۰	۴۵	۷۰	ست	تکرار
۱۱-۱۲	۴۰	۷۵	۴۰	۷۵	ست	تکرار

جدول ۳: متغیرهای کنترل در پیش‌آزمون (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)

گروه		متغیر	
گروه ترکیبی (۱۱ نفر)	گروه هوازی (۱۱ نفر)		
۷/۱۵ $\pm$ ۰/۸۱	۷/۱۸ $\pm$ ۱/۱۵	هموگلوبین A1c (درصد)	شاخص‌های خونی
۱۳۶/۶۴ $\pm$ ۶۸/۰۸	۱۵۱/۲۷ $\pm$ ۴۲/۶۱	قند خون ناشتا (mg/dL)	
۳۱۹/۸۳ $\pm$ ۹۴/۵۱	۳۰۷/۹۱ $\pm$ ۷۱/۴۷	قند خون دو ساعته (mg/dL)	
۱۵۸/۸۲ $\pm$ ۲۳/۳۱	۱۵۸/۷۳ $\pm$ ۳۳/۴۲	میانگین قند خون تخمینی (mg/dL)	
۱۳۳/۳۶ $\pm$ ۲۳/۴۱	۱۳۷/۵۵ $\pm$ ۴۲/۷۸	کلسترول (mg/dL)	نیمرخ چربی
۱۱۸/۸۲ $\pm$ ۵۶/۷۰	۱۶۹/۶۴ $\pm$ ۸۲/۸۲	تری گلیسرید (mg/dL)	
۳۶/۲۷ $\pm$ ۷/۰۲	۳۷/۷۲ $\pm$ ۵/۰۶	HDL (mg/dL)	
۷۶/۲۷ $\pm$ ۱۴/۹۱	۷۱/۷۲ $\pm$ ۳۱/۰۲	LDL (mg/dL)	
۲۵۲/۱۸ $\pm$ ۶۲/۸۶	۳۵۴/۱۴ $\pm$ ۱۸۷/۵۹	چربی کل (U/L)	هورمون
۱۰/۳۳ $\pm$ ۶/۶۳	۱۲/۳۴ $\pm$ ۱۰/۸۲	انسولین (μ U/mL)	
۶/۰۲ $\pm$ ۱/۵۹	۶/۴۰ $\pm$ ۱/۷۹	سلول‌های سفید خون ($10^9/uL$)	شمارش کامل سلول‌های خونی
۴/۹۰ $\pm$ ۰/۲۹	۴/۸۸ $\pm$ ۰/۳۴	سلول‌های قرمز خون ($10^6/uL$)	
۱۴/۷۰ $\pm$ ۰/۸۷	۱۴/۲۹ $\pm$ ۰/۹۱	هموگلوبین (g/dL)	
۴۳/۵۹ $\pm$ ۲/۶۹	۴۲/۴۹ $\pm$ ۲/۸۴	هماتوکریت (درصد)	
۲۰۵/۸۲ $\pm$ ۶۶/۳۲	۲۰۷/۵۵ $\pm$ ۳۷/۰۶	پلاکت ($10^3/uL$)	ترکیب بدنی
۳۲/۹۳ $\pm$ ۵/۹۹	۳۴/۶۹ $\pm$ ۵/۷۵	وزن عضله (kg)	
۲۶/۰۷ $\pm$ ۸/۴۱	۲۶/۵۱ $\pm$ ۸/۲۹	وزن چربی (kg)	
۴۳/۱۰ $\pm$ ۷/۴۶	۴۵/۵۰ $\pm$ ۷/۱۲	کل آب بدن (kg)	
۵۸۷۰ $\pm$ ۱۰/۱۳	۶۱/۷۵ $\pm$ ۹/۸۳	توده بدون چربی (kg)	انرژی
۰/۹۲ $\pm$ ۰/۰۳	۰/۹۳ $\pm$ ۰/۰۴	نسبت دور کمر به لگن	
۱۶۳۷/۵ $\pm$ ۲۱۹/۰۱	۱۷۰۴/۴ $\pm$ ۲۱۱/۹۶	کل انرژی دریافتی (kcal)	فیزیولوژیکی
۲۹/۹۸ $\pm$ ۴/۷۸	۳۰/۳۲ $\pm$ ۷/۱۷	حداکثر اکسیژن مصرفی (mL/kg/min)	
۱۲۸/۷۳ $\pm$ ۱۱/۸۳	۱۲۲/۰ $\pm$ ۹/۴۶	فشار خون سیستولی دست چپ (mmHg)	
۱۲۶/۷۳ $\pm$ ۱۲/۰	۱۲۵/۶۴ $\pm$ ۱۱/۳۷	فشار خون سیستولی دست راست (mmHg)	
۷۹/۴۵ $\pm$ ۷/۴۳	۷۴/۷۲ $\pm$ ۵/۳۸	فشار خون دیاستولی دست چپ (mmHg)	
۷۷/۶۳ $\pm$ ۷/۰۳	۷۲/۷۲ $\pm$ ۶/۵۲	فشار خون دیاستولی دست راست (mmHg)	

جدول ۴: متغیرهای عصبی در پیش‌آزمون و پس‌آزمون (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد) (هر گروه ۱۱ نفر)

بین گروهی		درون گروهی		مرحله		گروه	متغیر
sig	t	sig	t	پس‌آزمون	پیش‌آزمون		
۰/۲۳۸	۱/۲۴	۰/۰۴۰	-۲/۳۵	۳/۰۲ $\pm$ ۲/۴۶	۱/۶۱ $\pm$ ۱/۵۲	گروه هوازی	سرعت هدایت عصب سورال (متر بر ثانیه)
		۰/۰۰۷	-۳/۳۶	۳/۵۷ $\pm$ ۰/۵۳	۲/۹۴ $\pm$ ۰/۸۹	گروه ترکیبی	
۰/۵۱۵	۰/۶۶	۰/۰۲۰	-۲/۷۶	۳۵/۸۱ $\pm$ ۳/۸۹	۳۴/۱۰ $\pm$ ۳/۸۱	گروه هوازی	سرعت هدایت عصب پرونتال (متر بر ثانیه)
		۰/۰۴۰	-۲/۳۶	۳۸/۶۳ $\pm$ ۴/۱۰	۳۷/۴۵ $\pm$ ۳/۷۷	گروه ترکیبی	
۰/۵۳۶	۰/۶۳	۰/۰۰۱	-۴/۵۳	۳۵/۱۸ $\pm$ ۲/۷۵	۳۲/۶۳ $\pm$ ۲/۸۳	گروه هوازی	سرعت هدایت عصب تیبیال (متر بر ثانیه)
		۰/۰۱۳	-۳/۰۳	۳۸/۰۹ $\pm$ ۳/۲۰	۳۶/۰۹ $\pm$ ۲/۸۷	گروه ترکیبی	
۰/۵۳۶	-۰/۶۳	۰/۰۳۰	-۲/۵۲	۶/۱۶ $\pm$ ۵/۲۳	۴/۰۰ $\pm$ ۳/۳۱	گروه هوازی	آمپلی‌تود پتانسیل عمل عصب سورال (میلی‌ولت)
		۰/۰۲۰	-۲/۷۸	۸/۷۶ $\pm$ ۲/۹۳	۵/۷۲ $\pm$ ۳/۵۵	گروه ترکیبی	
۰/۰۱۶	-۲/۸۲	۰/۰۲۸	-۲/۵۷	۲/۰۰ $\pm$ ۱/۳۲	۱/۷۶ $\pm$ ۱/۲۴	گروه هوازی	آمپلی‌تود پتانسیل عمل عصب پرونتال (میلی‌ولت)
		۰/۰۰۵	-۳/۵۵	۲/۸۳ $\pm$ ۱/۴۸	۱/۴۸ $\pm$ ۰/۸۱	گروه ترکیبی	
۰/۰۳۰	-۲/۳۳	۰/۴۳۴	-۰/۸۱	۴/۰۷ $\pm$ ۲/۲۱	۳/۷۲ $\pm$ ۲/۶۴	گروه هوازی	آمپلی‌تود پتانسیل عمل عصب تیبیال (میلی‌ولت)
		۰/۰۰۶	-۳/۴۶	۶/۹۳ $\pm$ ۱/۷۸	۴/۹۰ $\pm$ ۲/۳۰	گروه ترکیبی	

یافته ها

میانگین همه متغیرها در پیش آزمون همگن بود و تفاوت معنی-داری با همدیگر نداشتند. میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای کنترل در جدول ۳ آورده شده است. بررسی تغییرات هدایت عصبی با استفاده از آزمون تی وابسته نشان داد که میانگین سرعت هدایت عصب سورا، پروئال و تیبیال و همچنین آمپلیتود پتانسیل عمل عصب سورا و پروئال نسبت به پیش آزمون هم در گروه هوازی و هم در گروه ترکیبی به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$). با این حال آمپلیتود پتانسیل عمل عصب تیبیال در گروه ترکیبی نسبت به پیش آزمون به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$)، اما در گروه هوازی تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). نتایج آزمون تی مستقل در مقایسه بین گروهی اختلاف داده های پیش-آزمون و پس آزمون نشان داد که تغییرات آمپلیتود پتانسیل عمل عصب پروئال و تیبیال در در گروه ترکیبی بیشتر از گروه هوازی می باشد ($P < 0/05$)، اما تغییرات سرعت هدایت عصب سورا، پروئال و تیبیال و آمپلیتود پتانسیل عمل عصب سورا در دو گروه معنی دار نبود ($P > 0/05$) (جدول ۴).

بحث

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و ترکیبی بر هدایت عصبی مردان دیابتی نوع دو مبتلا به نوروپاتی محیطی بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میانگین سرعت هدایت عصب سورا، پروئال و تیبیال و آمپلیتود پتانسیل عمل عصب سورا و پروئال نسبت به پیش آزمون هم در گروه هوازی و هم در گروه ترکیبی به طور معنی داری افزایش یافت. همچنین میانگین آمپلیتود پتانسیل عمل عصب تیبیال در گروه ترکیبی نسبت به پیش آزمون به طور معنی داری افزایش یافت. علاوه بر این مشاهده شد که دامنه تغییرات آمپلیتود پتانسیل عمل عصب پروئال و تیبیال در دو گروه تفاوت معنی داری داشت و در گروه ترکیبی افزایش معنی داری نسبت به گروه هوازی وجود داشت. در مورد سرعت هدایت عصبی، این نتایج با یافته های Gholami، Hung و همکاران و Balducci و همکاران همسو می باشد. Gholami در تحقیق خود با عنوان تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر کنترل گلوکز و سرعت هدایت عصبی، که روی ۱۲ مرد مبتلا به نوروپاتی محیطی انجام داده بود، نشان داد که سرعت هدایت عصبی هم در اعصاب حسی و هم در اعصاب حرکتی افزایش معنی داری یافته بود (۱۴). Hung و همکاران در تحقیقی بر روی ۲۸ مرد دیابتی گزارش کردند که ۱۲ هفته تمرین تایچی، سرعت هدایت عصبی در اعصاب حسی و حرکتی را بهبود می بخشد (۱۹). Balducci و همکاران نیز که تأثیر فعالیت منظم در یک دوره بلندمدت چهار ساله را بر شروع علائم نوروپاتی دیابت در ۷۸ بیمار دیابتی نوع دو و فاقد علائم بالینی و نوروفیزیولوژیک

در ابتدا و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، با استفاده از دستگاه آنالایزر ترکیب بدن (Inbody 230، Frequency: 20kHz, 100kHz – Display: 240*320 Color LCD) بدنی آزمودنی ها انجام گرفت. همچنین فشار خون سیستولی و دیاستولی هر دو دست نیز اندازه گیری شد. نمونه خون نیز به صورت ناشتا اندازه گیری شد و پس از نوشیدن ۸۲/۵ گرم محلول مونوهیدرات دکستروز (۱۷) نمونه خون دو ساعته نیز از آزمودنی ها گرفته شد. غلظت گلوکز با استفاده از روش رنگ سنجی بیوشیمیایی اندازه گیری شد. غلظت هموگلوبین گلیکوزیله با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر Mindry BS800 اندازه گیری شد. غلظت های تری-گلیسرید، کلسترول تام، HDL و LDL با استفاده از روش کالری-متری آنزیماتیک تعیین شد. تمام کیت های مورد استفاده در تحقیق از شرکت پارس آزمون ایران و پیشتاز تهیه شد. سرعت هدایت عصبی و آمپلیتود پتانسیل عمل به وسیله دستگاه EMG مدل Myto II ساخت کشور ایتالیا اندازه گیری شد. اندازه گیری های عصبی به صورت درازکش و از پای راست به عمل آمد. برای اندازه گیری سرعت هدایت عصب و آمپلیتود پتانسیل عمل عصب پروئال، ثبت از عضله کوتاه بازکننده انگشتان پا (Extensor digitorum brevis muscle) صورت گرفت و الکتروود سطحی اول در محل بطن عضله کوتاه بازکننده انگشتان پا و الکتروود دوم در مفصل کف-پایی بند انگشتی پنجم (Fifth metatarsophalangeal joint) یا روی انگشت پنجم قرار گرفت. در مورد عصب تیبیال، ثبت از عضله دور کننده شست پا (Abductor Hallucis muscle) صورت گرفت و الکتروود اول در یک سانتی متر پشت و یک سانتی متر زیر برجستگی استخوان ناوی (Navicular tubercle) در قسمت داخلی پا و الکتروود دوم در مفصل کف پای بند انگشتی یا قسمت دیستال انگشت اول قرار گرفت. در مورد عصب سورا نیز، الکتروود اول با فاصله سه سانتی متر در قسمت خلفی قوزک خارجی (Malleolus) و الکتروود دوم در نزدیکی قوزک خارجی قرار گرفت (۱۸). از آزمودنی ها خواسته شد تا رژیم غذایی معمول خود و میزان مصرف دارو را در طول تحقیق حفظ کنند و در صورت تغییر، آن را گزارش نمایند. بعد از جمع آوری داده های حاصل از پژوهش، از آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) برای توصیف داده ها استفاده شد. در ادامه با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک نرمال بودن توزیع آنها بررسی شد. از آنجا که همگی داده ها نرمال بودند، از آزمون های پارامتریک استفاده شد. برای مقایسه داده های پیش آزمون و پس آزمون در هر گروه از آزمون تی زوجی و برای بررسی تفاوت بین گروهی، ابتدا اختلاف داده های پیش آزمون و پس آزمون در هر گروه محاسبه، سپس دامنه تغییرات به دست آمده برای هر گروه با استفاده از آزمون تی مستقل مقایسه شدند. تمامی داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS20 و با سطح معنی داری $P \leq 0/05$ تجزیه و تحلیل شدند.

اکسید را مهار می‌کند. این پدیده یک مکانیسم مهم در اختلال عملکرد اندوتلیالی در نوروپاتی دیابت می‌باشد (۵، ۲۴). اعتقاد بر این است که تمرینات هوازی موجب تأثیر مطلوب بر عوامل خطرزای متابولیک مانند نیم‌رخ لیپیدی، چربی زیرپوستی و گلوکز خون بیماران دیابتی می‌شود (۲۵). در این راستا، تحقیقات نشان داده‌اند که در اثر تکرار فعالیت ورزشی، بیان ناقل GLUT4 افزایش یافته و میزان کلی آن در سطح سلول‌های عضلانی بیشتر می‌شود که در نهایت منجر به افزایش حساسیت سلول‌های عضلانی به انسولین، بهبود عمل انسولین و کاهش سطح قند خون به مقادیر طبیعی می‌گردد (۸). نشان داده شده است که فعالیت بدنی یکی از روش‌های افزایش جریان خون در اندام تحتانی است و سرعت هدایت عصبی در ۳۰ دقیقه اول پیاده‌روی در افراد سالم افزایش می‌یابد (۲۶). این روند، عامل مؤثری در بهبود کارکرد اعضای مختلف بدن از جمله عملکردهای عصبی و عضلانی می‌باشد (۲۷). در واقع با افزایش فعالیت ورزشی و در نتیجه افزایش کنترل قند خون، آسیب به اعصاب کاهش یافته و می‌تواند منجر به کاهش عوارض ناشی از نوروپاتی حسی حرکتی شود که در اثر تخریب سلول‌های عصبی رخ می‌دهد (۹). برخلاف بیشتر سلول‌های بدن که برای گرفتن گلوکز از خون به انسولین نیاز دارند، سلول‌های عصبی به انسولین نیاز نداشته و گلوکز بدون واسطه وارد این سلول‌ها شده و مقدار گلوکز در این سلول‌ها بیش از حد معمول می‌شود. در نهایت گلوکز به سوربیتول تبدیل شده و سوربیتول نیز به قند پنج کربنی فروکتوز تبدیل می‌شود. سوربیتول باعث ایجاد تأثیرات اسمزی در عصب شده و نهایتاً به آسیب عصبی منجر می‌شود. تجمع فروکتوز نیز با تخلیه میواینوزیتول، که از اجزای فسفولیپیدی غشای سلولی می‌باشد، باعث کاهش انتقال آکسونی، کاهش تولید انتقال دهنده عصبی شده و در نهایت کاهش هدایت عصبی می‌شود. در نهایت، نوروپاتی سمپاتیک در نتیجه این آسیب عصبی و کاهش هدایت عصبی ایجاد می‌گردد (۲۸). تمرین مقاومتی می‌تواند حجم، قدرت و توان عضله را بهبود بخشیده و به عنوان یک ابزار درمانی سالم در نظر گرفته شود. همچنین تمرین مقاومتی می‌تواند حساسیت انسولین و مصرف روزانه انرژی را افزایش داده و کیفیت زندگی را بهبود بخشد (۱۱). از سوی دیگر، تمرین هوازی می‌تواند اثر انسولین را بر هر فیبر عضلانی بدون افزایش اندازه فیبر تغییر دهد که بیشتر بر سرعت هدایت عصبی مؤثر می‌باشد، در حالی که تمرینات مقاومتی ترجیحاً جذب گلوکز را با افزایش اندازه هر فیبر عضلانی بهبود می‌بخشد که بیشتر بر آمپلی‌تود مؤثر می‌باشد. از این رو، تمرینات ترکیبی می‌تواند اثرات مضاعف ناشی از مکانیسم‌های جبرانی هر دو نوع ورزش را اعمال کند و برای افراد دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی مؤثرتر واقع گردند (۱۲).

نوروپاتی محیطی بررسی کرده بودند نشان دادند که سرعت هدایت عصبی در اعصاب حسی و حرکتی در بیماران دیابتی نوع دو در اثر تمرینات ورزشی بهبود یافت، اما در گروه کنترل سرعت هدایت عصبی تضعیف شد. همچنین درصد بیماران دیابتی که در آنها نوروپاتی حسی و حرکتی پیشرفت کرده بود در گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر از گروه تمرین بود (۲۰). در مقابل این یافته‌ها با نتایج Kluding و Gholami و همکاران مغایر می‌باشد. Kluding و همکاران در تحقیق خود با عنوان تأثیر هشت هفته فعالیت ورزشی منظم شامل تمرینات هوازی و قدرتی روی ۱۷ نفر از افراد دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی، به این نتیجه رسیدند که سرعت هدایت عصبی و آمپلی‌تود پتانسیل اعصاب طولی تحتانی در اثر تمرین تغییر معنی‌داری نمی‌کند (۹). Gholami (۲۰۱۵) نیز نشان داد که آمپلی‌تود پتانسیل عمل با وجود افزایش، تغییر معنی‌داری نکرده بود (۱۴). Balducci و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان دادند که تغییر معنی‌داری در آمپلی‌تود پتانسیل عمل اعصاب محیطی در دو گروه وجود ندارد (۲۰). در تحقیق حاضر از تمرینات هوازی و ترکیبی به مدت ۱۲ هفته استفاده شد. غلامی و همکاران (۲۰۱۵) فقط از تمرینات هوازی استفاده کرده بودند و در تحقیق Kluding و همکاران (۲۰۱۲) نیز مدت تمرینات هشت هفته بود. علت مغایرت این نتایج را می‌توان به تفاوت در پروتکل تمرینی، که طول مدت تمرین در این تحقیقات کوتاه بوده است و همچنین عدم استفاده از تمرینات ترکیبی و مقاومتی نسبت داد. پارامترهای نورولوژیکی مانند سرعت هدایت عصبی، الکترومایوگرافی، فراخوانی واحد حرکتی و رفلکس هافمن همگی در پاسخ به فعالیت ورزشی امکان تغییر دارند که سازوکارهای احتمالی بهبود عملکرد در نتیجه تمرین شامل تغییر در جابجایی موقت فعال‌سازی عضله برای کارایی حرکتی بیشتر، فراخوانی ترجیحی واحدهای حرکتی سریع‌تر، شلیک عصبی سریع‌تر، رهایش یون کلسیم، افزایش Ca^{2+} ATPase و تحریک‌پذیری نورون حرکتی می‌باشد (۲۱، ۲۲). میزان نوروپاتی با افزایش فشار خون، کنترل نامناسب قند خون، افزایش چربی‌های خون، افزایش شاخص توده بدنی و افزایش ترشح آلبومین در ادرار افزایش می‌یابد. همچنین اختلال در جریان خون عروق کوچک می‌تواند باعث هیپوکسی و نهایتاً آسیب نورونی شود (۲۳). سازگاری‌های متعددی در اثر تمرینات ورزشی رخ می‌دهد که می‌تواند توجیه کننده علت تغییرات در عملکرد اعصاب طولی اندام تحتانی به ویژه سرعت هدایت عصبی در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی باشد. این سازگاری‌ها به عوامل متعددی از جمله عوامل متابولیک و عروقی بستگی دارد، با این حال به نظر می‌رسد که احتمالاً هاپیرگلیسمی مهمترین نقش را داشته باشد. هاپیرگلیسمی می‌تواند باعث فعال‌سازی پروتئین کیناز C شود که تولید نیتریک

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان بیان نمود که هر دو تمرین هوازی و ترکیبی روش‌های مؤثری در کنترل دیابت نوع دو محسوب می‌شوند، ولی به نظر می‌رسد تمرین ترکیبی نسبت به تمرین هوازی بهبود بیشتری را در سرعت هدایت عصبی و آمپلیتود پتانسیل عمل عصب نشان می‌دهد. از محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم کنترل دقیق رژیم غذایی و کنترل دارویی آزمودنی‌ها و همچنین تعداد کم آزمودنی‌ها اشاره کرد. لذا پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده، در کنار مداخلات تمرینی، کنترل دقیق این عوامل نیز صورت گیرد.

قدردانی

با سپاس به درگاه خداوند متعال، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از تمامی افرادی که در اجرای این تحقیق محققان را یاری نموده‌اند، به ویژه مسئولین بیمارستان سینا و آزمودنی‌های عزیز

صمیمانه سپاسگزاری نمایند. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری در دانشگاه تبریز به شماره (2440428) می‌باشد. پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، استان آذربایجان شرقی به شماره مرجع IR.TBZMED.REC.1395.966 به تایید رسیده است.

تضاد منافع

مؤلفان مطالعه حاضر اظهار می‌دارند که منافع متقابل از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند. همچنین حمایت مالی در این پایان‌نامه صورت نگرفت.

مشارکت مؤلفان

س. دن، و. س. ص و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مؤلفان، مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

- Li S, Guo S, He F, Zhang M, He J, Yan Y, et al. Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Fasting Glucose, Associated with Risk Factors in Rural Kazakh Adults in Xinjiang, China. *International journal of environmental research and public health* 2015; **12**(1): 554-565. doi:10.3390/ijerph120100554
- Khanbabazade M, Ebrahimi Atri A. Comprision of the effect of aerobic and weight resistance training protocols on balance and neuron growth factor (NGF) on the Neuropathy-Diabetic Men. *SSU_Journals* 2015; **23**(2): 1866-1877. (persian)
- Sadeghi R, Rezaeian M, Khanjani N, Iranpour A. The Applied of Health Belief Model in Knowledge, Attitude and Practice in People Referred for Diabetes Screening Program: An Educational Trial. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 2015; **13**(11): 1061-1072. (persian)
- Shaw J E, Sicree R A, Zimmet P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice* 2010; **87**(1): 4-14. doi: 10.1016/j.diabres.2009.10.007
- Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2012; **28**(S1): 8-14. doi: 10.2337/diacare.27.6.1458
- Boulton A J, Malik R A, Arezzo J C, Sosenko J M. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes care* 2004; **27**(6): 1458-1486. doi: 10.2337/diacare.27.6.1458
- Hunt D. Using evidence in practice: foot care in diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 2002; **31**(3): 603-611. doi: 10.1016/S0889-8529(02)00022-1
- Nikookheslat S, Gholami F, Salek-Zamani Y, Jafari A, Faraji E. Effect of 12-Week Aerobics Training on Metabolic Control in Type-2 Diabetic Men with Peripheral Neuropathy. 2015. (persian).
- Kluding P M, Pasnoor M, Singh R, Jernigan S, Farmer K, Rucker J, et al. The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes and its Complications* 2012; **26**(5): 424-429. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.05.007
- Ghazalian F, Nikbakht H, Ebrahimi E, Salavati M. Effects of training style on neuromuscular adaptation in untrained men. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2010; **18**: 1-8. (persian).
- Arora E, Shenoy S, Sandhu J. Effects of resistance training on metabolic profile of adults with type 2 diabetes. *Indian J Med Res* 2009; **129**(5): 515-519.
- Eves N D, Plotnikoff R C. Resistance training and type 2 diabetes considerations for implementation at the population level. *Diabetes Care* .2006; **29**(8): 1933-1941. doi: 10.2337/dc05-1981
- Colberg S R, Sigal R J, Fernhall B, Regensteiner J G, Blissmer B J, Rubin R R, et al. Exercise and type 2 diabetes the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes care* 2010; **33**(12): e147-e167. doi: 10.2337/dc10-9990
- Gholami F. Effect of 12 weeks aerobic training on glucose control and neural conduction in type-2 diabetes men with peripheral neuropathy. thesis in phd,

- tabriz university, faculty of sport physiology. 2015:110. (persian)
15. Church T S, Blair S N, Cocreham S, Johannsen N, Johnson W, Kramer K, et al. Effects of aerobic and resistance training on hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Jama* 2010; **304**(20): 2253-2262. doi: 10.1001/jama.2010.1710
 16. Sigal R J, Kenny G P, Boulé N G, Wells G A, Prud'homme D, Fortier M, et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 2007; **147**(6): 357-369. doi: 10.7326/0003-4819-147-6-200709180-00005
 17. Alberti K J, Zimmet P Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Health Organization, *Department of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva* 1999; **15**: 7. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)
 18. Amato A A, Dumitru D, Machiel Z J. *Electrodiagnostic medicine*. 2nd ed. 2002; 211-215.
 19. Hung J-W, Liou C-W, Wang P-W, Yeh S-H, Lin L-W, Lo S-K, et al. Effect of 12-week tai chi chuan exercise on peripheral nerve modulation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of rehabilitation medicine* 2009; **41**(11): 924-929. doi: 10.2340/16501977-0445
 20. Balducci S, Iacobellis G, Parisi L, Di Biase N, Calandriello E, Leonetti F, et al. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *Journal of diabetes and its complications* 2006; **20**(4): 216-223. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2005.07.005
 21. Cormie P, McGuigan M R, Newton R U. Developing maximal neuromuscular power. *Sports medicine* 2011; **41**(1): 17-38. doi: 10.2165/11537690-000000000-00000
 22. Damyrchy A, Mohebbi H, Hosseini S. Isotonic strength training effect on maximal voluntary contraction electroneurographic parameters and athletes. *Olympic Journal* 2009; **39**(3): 22-33. (persian)
 23. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton S E, Ward J D, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *New England Journal of Medicine* 2005; **352**(4): 341-350. doi: 10.1056/NEJMoa032782
 24. Cameron N, Eaton S, Cotter M, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2001; **44**(11): 1973-1988. doi: 10.1007/s001250100001
 25. Boulé NG, Haddad E, Kenny G P, Wells G A, Sigal R J. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Jama* 2001; **286**(10): 1218-1227. doi: 10.1001/jama.286.10.1218.
 26. Halar E, Hammond M, Dirks S. Physical activity: its influence on nerve conduction velocity. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 1985; **66**(9): 605-609.
 27. Sparks L M, Johannsen N M, Church T S, Earnest C P, Moonen-Kornips E, Moro C, et al. Nine months of combined training improves ex vivo skeletal muscle metabolism in individuals with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013; **98**(4): 1694-1702. doi: 10.1210/jc.2012-3874
 28. Mera S L. *Understanding disease: pathology and prevention*. Nelson Thornes; 1996.

Original Article

The effect of *Oscillatoria* Cyanobacterium extract on breast cancer cell line and study of apoptosis, necrosis and Noxa gene expression

Hamid Reza Rahmatollahi¹, Ali Salehzadeh^{2*}, Seyed Ataollah Sadat Shandiz³

¹MSc. Student in Microbial Biotechnology, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

²Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

³Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

Received: 29 April 2017 Accepted: 18 July 2017 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):56-64

Abstract

Background: Breast cancer is the most common cause of cancer. The aim of the current study was to evaluate the cytotoxicity, apoptotic effects and Noxa gene expression of *Oscillatoria* extract against human breast cancer (MCF-7) cell line.

Methods: The MCF-7 cells were treated with different concentration of extracts ranging 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL for 24 and 48 hours. The cytotoxicity activity of *Oscillatoria* extract towards cancer cells were evaluated by using colorimetric MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay. The Noxa gene expression was measured via real time PCR technique. Finally, apoptotic and necrosis study of extract was analyzed using Flow-cytometry method.

Results: Cytotoxic results clarified that the desired extracts have a dose-dependent toxicity effect and viability of the cells significantly decreased. Noxa gene expression levels in MCF-7 cells were increased to 33.93 ± 1.6 ($P < 0.001$) compared to the control group. In addition, the flow-cytometry data revealed the 43.07 % apoptosis in breast cancer cell line.

Conclusion: It seems that *Oscillatoria* extract has potential uses for treatment of breast cancer and it suggested that further investigations were performed for *Oscillatoria* pharmaceutical importance.

Keyword: Oscillatoria, Breast cancer, Noxa, Apoptosis.

How to cite this article: Rahmatollahi H R, Salehzadeh A, Sadat Shandiz S A. [The effect of <i>Oscillatoria</i> Cyanobacterium extract on breast cancer cell line and study of apoptosis, necrosis and Noxa gene expression]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):56-64. Persian.
--

مقاله پژوهشی

اثر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* روی رده سلولی سرطان پستان و مطالعه آپوپتوز، نکروز و بیان ژن *Noxa*حمید رضا رحمت‌اللهی^۱، علی صالح‌زاده^{۲*}، سید عطاله سادات شاندیز^۳ 

^۱ کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
^۳ گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 * نویسنده مسئول؛ ایمیل: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۵۶-۶۴

چکیده

زمینه: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها به شمار می‌رود که سالانه منجر به مرگ در بین خانم‌ها می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا (*Oscillatoria*) بر روی میزان سمیت، آپوپتوز و بیان ژن *Noxa* در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) می‌باشد. روش کار: در این مطالعه، رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) با غلظت‌های مختلف عصاره اسیلاتوریا (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شد. فعالیت سمی عصاره بر روی رده سلولی سرطانی با کمک روش رنگ‌سنجی MTT ارزیابی شد. میزان بیان ژن *Noxa* با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، مطالعه آپوپتوز و نکروز عصاره با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج سمیت سلولی بیانگر آن بود که عصاره مورد بررسی سمیت وابسته به دوز دارد و میزان زنده ماندن سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بیان ژن *Noxa* در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره اسیلاتوریا به میزان $33/93 \pm 1/6$ ($P < 0/001$) نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد. علاوه بر این، داده‌های فلوسایتومتری میزان آپوپتوزی ۴۳/۰۷ درصدی را در رده سلولی سرطان پستان نشان داد. نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا می‌تواند، پتانسیل بالقوه‌ای در درمان سرطان پستان داشته باشد و پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های بیشتری در خصوص اهمیت دارویی عصاره اسیلاتوریا صورت گیرد.

کلید واژه‌ها: اسیلاتوریا، سرطان پستان، *NOXA*، آپوپتوز.

نحوه استناد به این مقاله: رحمت‌اللهی ح ر، صالح‌زاده ع، سادات شاندیز س ع. اثر عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* روی رده سلولی سرطان پستان و مطالعه آپوپتوز، نکروز و بیان ژن *Noxa*. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۵۶-۶۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین خانم‌ها می‌باشد که در حدود ۳۰٪ از سرطان‌ها در بین خانم‌ها را در بر می‌گیرد. هر چند مرگ و میر ناشی از این سرطان از سال ۱۹۹۰ کم شده است، ولی همچنان بیشترین عامل مرگ در بین خانم‌های ۳۵ تا ۵۵ سال به شمار می‌رود (۱). با وجود آن که بالاترین فراوانی این بدخیمی مربوط به کشورهای توسعه یافته است، اما تحقیقات نشان می‌دهد که شیب افزایش شیوع سرطان پستان در کشورهای در حال توسعه بیشتر بوده و متوسط عمر بیماران مبتلا در این کشورها کمتر می‌باشد (۲). طی مطالعات انجام شده مشخص شده است که میزان شیوع سرطان پستان در کشور ایران نسبت به کشورهای توسعه یافته کمتر است، اما با این حال، این بدخیمی همچنان به عنوان شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی مطرح بوده و اطلاعات موجود، از افزایش شیوع این بدخیمی طی دو دهه گذشته در ایران حکایت دارد (۳). بیشترین میزان شیوع سرطان پستان در کشورهای غربی و کشورهای توسعه یافته در گروه‌های سنی ۵۰ تا ۶۰ سال است. در حالی که بیشترین میزان شیوع سرطان پستان در ایران سنین ۴۰ تا ۵۰ سال می‌باشد (۴ و ۵). از جمله راهکارهای درمانی این بدخیمی می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی اشاره کرد، با این حال میزان مرگ و میر در این بیماران بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد (۶). از جمله عواملی که در بروز این سرطان موثر است می‌توان به تنباکو، ارگانسمهای عفونی، تغذیه ضعیف، عوامل شیمیایی، اشعه و جهش‌های ژنتیکی اشاره نمود (۷). مشخص شده است که مصرف برخی فرآورده‌های غذایی به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از بروز سرطان نقش مؤثری دارند (۸). پدیده آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، مهمترین شکل خودکشی فیزیولوژیک سلول به شمار می‌رود که سلول‌های ناخواسته، بدون آسیب دیدن بافت‌ها یا سلول‌های اطراف، حذف می‌شوند. سلول‌های سرطانی از مرگ برنامه‌ریزی شده فرار می‌کنند که یکی از دلایل آن تغییر در بیان ژن‌هایی است که در تنظیم این فرآیند دخیل می‌باشند. عوامل گوناگونی از قبیل آنزیم‌ها، گیرنده‌ها، مولکول‌های سیگنال و پروتئین‌های تنظیم‌کننده ژن، القا و انجام مسیر آپوپتوز را تعیین می‌نمایند. در میان آنها، پروتئین P53 و سیستم سیگنال‌دهی کاسپاز آبشاری عوامل اصلی برای اجرای آپوپتوز هستند، که توسط مولکول‌های مختلفی از قبیل مهارکننده پروتئین آپوپتوز (IAP)، خانواده پروتئین‌های BCL2 و کالپین تنظیم می‌شوند (۹). ژن Noxa به عنوان زیر خانواده پروآپوپتوتیک BCL2 می‌باشد که در آپوپتوز سلولی نقش دارد. این ژن کد کننده ۱۰۳ اسید آمینه می‌باشد و در مسیرهای وابسته به P53 و غیروابسته به P53 بعد از آسیب به DNA سلول در مرگ سلولی دخالت دارد (۱۰). با توجه به

مطالعاتی که بر روی سیانوباکتری اسیلاتوریا انجام گرفته، مشاهده شده است که این سیانوباکتری مواد شیمیایی گیاهی تولید نموده که می‌تواند به‌عنوان ممانعت‌کننده سلول کارسینومایی آسیت‌های ارلیخ (Ehrlich Carcinoma Ascites Cell) و رده سلولی سرطان هپاتوسلولار انسانی (HepG2) باشد (۱۱). از جمله موادی که از عصاره سیانوباکتری‌ها به دست آمده و خاصیت درمانی دارند می‌توان به بوروفیسین، آپراتوکتین A، کریپتوفیسین-۵، لارگازول و کوراسین A (۱۲-۱۴) اشاره نمود. با توجه به شیوع سرطان پستان در ایران، و شیب صعودی این بدخیمی طی دو دهه گذشته، در این تحقیق بر آن شدیم تا اثربخشی عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا را بر روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بررسی کنیم. سلول‌های MCF-7 (رده سلولی انسانی سرطان پستان)، رده سلولی بسیار مناسب در مورد سرطان پستان محسوب می‌شود. برای این منظور بیان ژن Noxa که از جمله ژن‌های القا کننده مسیر آپوپتوز می‌باشد توسط عصاره سیانوباکتری Oscillatoria غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی MCF-7 سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار

ابتدا سیانوباکتری اسیلاتوریا در محیط کشت زایلندر منفی (سیگما، آلمان) کشت داده شد. سپس در شرایط استریل، سیانوباکتری‌ها به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح و در دمای اتاق ۲۶ درجه سلسیوس و شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه با دوره نوری (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور به همراه هوادهی ۲۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه) قرار گرفت. محیط کشت از کاغذ صافی واتمن با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و مخلوط صاف شده لیوفیلیزه گردید. به منظور تهیه عصاره سیانوباکتری، ۳ گرم پودر خشک‌شده آن با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد (سیگما، آلمان) مخلوط شد و روی شیکر انکوباتور در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از گذشت این مدت زمان، محلول مورد نظر از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره پس از صاف نمودن توسط دستگاه تقطیر در خلاء تا حد خشکی تغلیط و غلظت آن تعیین شد. بعد از این مرحله در شرایط استریل رقت‌های مختلف از عصاره تهیه شد. رده‌ی سلولی سرطانی پستان (MCF-7) از انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI₁₆₄₀ مکمل شده با ۱۰٪ FBS، ۲ میلی‌مولار از L-گلوتامین، ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر پنیسیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۰/۱ میلی‌مولار اسید آمینه‌های غیر ضروری و ۱ میلی‌مولار پیرووات سدیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند (۱۵). برای بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها از روش

رنگ‌سنجی MTT با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. سلول‌ها از فلاسک کشت سلولی جداسازی و جمع‌آوری شد سپس به آن محیط کشت دارای ۱۰٪ FBS اضافه شد و سوسپانسیون سلولی طوری رقیق شد که در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر میزان 10^5 سلول وجود داشته باشد و به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کشت انکوبه شد. پس از این زمان محیط کشت تخلیه شده و عصاره با غلظت‌های مورد نظر (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر خانه پلیت اضافه شد. گروه کنترل شامل چاهک‌های دارای سلول‌های تیمار نشده با عصاره سیانوباکتری در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان واکنش، مقدار ۰/۲ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۳ ساعت در شرایط کشت انکوباسیون انجام گرفت. سپس محلول رویی تخلیه و برای حل‌نمودن بلورهای فرمازان (شاخص مولکولی سلول‌های زنده) تولید شده به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شد و ظرف کشت سلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد جذب نوری توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا و در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۶). نتایج برحسب درصد سلول‌های زنده تیمار شده نسبت به شاهد، از فرمول شماره ۱ محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{جذب نوری سلول های تیمار نشده} / \text{جذب نوری سلول های تیمار شده با عصاره}) = \text{درصد زنده مانی سلولی}$$

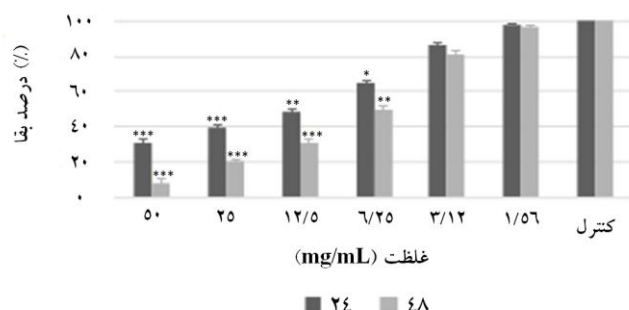
میزان بیان ژن‌های *Noxa* و *β -actin* با استفاده از روش کمیت سنجی Real Time PCR با استفاده از دستگاه ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) مدل مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. استخراج RNA با کشت سلولی تعداد 1×10^6 در هر ویال پلیت ۶ خانه‌ای آغاز گردید. پس از انکوباسیون در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تیمار با غلظت عصاره انجام گرفت. برای جداسازی RNA از کلروفوم و ایزوپروپانول و شستشوی آن از اتانول ۷۵ درصد استفاده شد. در پایان کار استخراج، از دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH, Germany) برای تعیین غلظت RNA استفاده گردید. برای ساخت cDNA، از مولکول‌های RNA استخراج شده با کمک کیت Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis محصول شرکت فرمتاز آمریکا استفاده شد. مخلوط واکنش PCR شامل یک میکروگرم RNA، ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر الیگو (dT)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی، یک

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$$

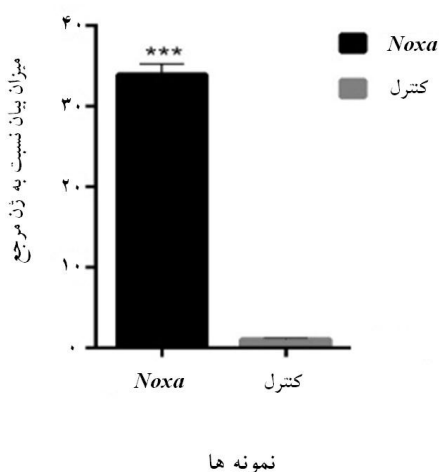
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{test sample}} - \Delta Ct_{\text{control sample}}$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

بالا: آپوپتوز تاخیری. در نمونه‌های تحت تیمار با عصاره، سلول‌ها وارد آپوپتوز اولیه با ۱۷/۴۳٪ و ۱۲/۱۷٪ آپوپتوز ثانویه شده‌اند.



نمودار ۱: درصد بقای سلول‌های MCF-7 در برابر غلظت‌های مختلف عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (***) $P < 0.001$, (***) $P < 0.001$, (***) $P < 0.001$, (n=3; $P < 0.001$)



نمودار ۲: بیان ژن Noxa: ژن β -actin به عنوان گروه کنترل و Noxa به عنوان گروه تیمار شده با غلظت IC_{50} بدست آمد

بررسی میزان درصد آپوپتوز و نکروز القاء شده در سلول‌های سرطان پستان تیمار شده با عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا با استفاده از کیت annexin V/PI رنگ‌آمیزی شده و سپس توسط دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شد. در طی مرحله آپوپتوز اولیه، فسفولیپیدهای فسفاتیدیل سرین (PS) به بیرون از غشاء پلاسمایی سلول منتقل شده و توسط آنکسین ۵ رنگ می‌شوند. همچنین هسته سلول نیز در زمان نکروز با معرف PI رنگ می‌گیرد. یافته‌های حاصل از بررسی فلوسایتومتری نشان داد که عصاره سلولی سیانوباکتری اسیلاتوریا بر روی آپوپتوز و نکروز موثر می‌باشد. در خوانش اول توسط فلوسایتومتری تعداد سلول‌ها در

به‌منظور بررسی میزان آپوپتوز و نکروز از خاصیت رنگی ایزوتیوسیانات-آنکسین ۵ و پروپیوم آیودایت با استفاده از دستور کار کیت Apoptosis Annexin V/Propidium iodide (PI) detection kit, Roch, Germany انجام گرفت. سلول‌های سرطانی پستان (MCF-7) با غلظت IC_{50} عصاره تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده سرطان پستان به عنوان کنترل به کار گرفته شدند. در نهایت ارزیابی درصد آپوپتوز/نکروز سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت. تمامی نتایج بدست آمده در این مطالعه بر اساس حداقل سه بار تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. تست‌های مقایسه‌ای داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و محاسبه Pvalue با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت. همچنین $P < 0.05$ در هر تست معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

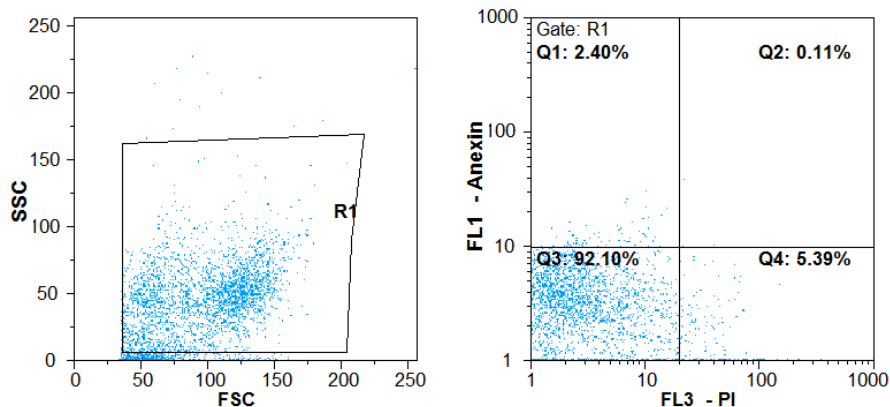
بررسی میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که عصاره سلولی سیانوباکتری اسیلاتوریا رشد سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد (نمودار ۱). به طوری که بیشترین مهار تکثیر در ۲۴ ساعت مربوط به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده و از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($P < 0.001$) این در حالی بود که غلظت ۱/۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداده و از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($p = 0.99$). مهار تکثیر سلولی و بقای سلول‌های MCF-7 در مدت زمان ۴۸ ساعت نشان داد که بیشترین میزان مهار مربوط به غلظت‌های ۵۰ و ۲۵ mg/ml است که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$). در حالیکه غلظت ۱/۵۶ mg/ml مهار رشد کمتری از سلول‌ها نسبت به گروه کنترل نشان داده که از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($P = 0.78$). نتایج محاسبه میزان IC_{50} مربوط به عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا در زمان ۲۴ ساعت برابر $11/8 \pm 1/245$ mg/ml ($P < 0.001$) بدست آمد و در ۴۸ ساعت ($P < 0.001$) $6/03 \pm 0/745$ mg/ml محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشند. تغییر در بیان ژن Noxa در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با عصاره سیانوباکتری Oscillatoria با استفاده از روش Real Time PCR بعد از ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب نسبت بیان ژن Noxa به ژن مرجع در رده سلولی تیمار شده با عصاره به میزان $33/93 \pm 1/6$ ($P < 0.001$) افزایش یافت که نشان‌دهنده تاثیر مثبت عصاره سیانوباکتری Oscillatoria در افزایش بیان ژن Noxa می‌باشد نمودار ۲.

مربع سمت چپ پایین: سلول‌های زنده، مربع سمت چپ بالا: آپوپتوز اولیه، مربع سمت راست پایین: نکروز، مربع سمت راست

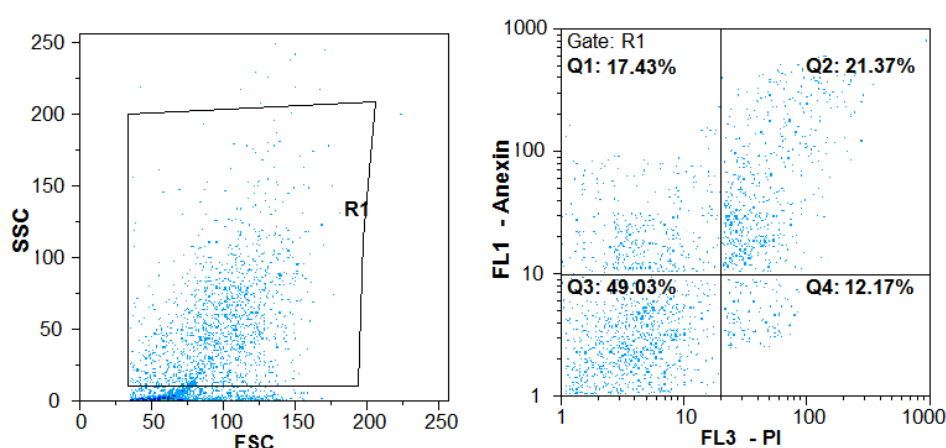
میزان درصد آپوپتوز و نکروز رده‌ی سلول به ترتیب برابر ۳۸/۰۸٪ و ۱۲/۱۷٪ افزایش یافت (نمودار ۴).

مناطق Q_1 ، Q_2 ، Q_3 و Q_4 به ترتیب برابر ۰/۱۱٪، ۲/۴۰٪، ۹۲/۱۰٪ و ۵/۳۹٪ بود که بعد از دادن عصاره سلولی به ترتیب ۱۷/۴۳٪، ۲۱/۳۷٪، ۴۹/۰۳٪ و ۱۲/۱۷٪ تغییر یافتند. با توجه به مقادیر بالا

(الف)

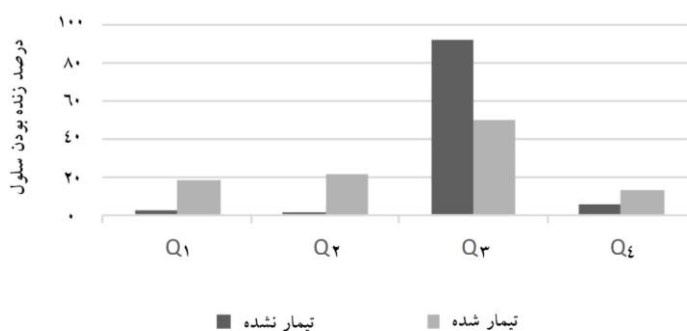


(ب)



نمودار ۳: نتایج آنالیز فلوسایتمتری تأثیر عصاره اسپلاتوریا بر روی رده سلولی سرطان پستان. نمونه کنترل تیمار نشده (الف)، نمونه تحت تیمار با عصاره (ب)

نتایج فلوسایتمتری



نمودار ۴: تصویر مربوط به سلول MCF-7 تیمار شده و تیمار نشده. با توجه به نمودار میزان آپوپتوز و نکروز به طور کلی ۴۳/۰۷٪ افزایش یافته است.

بحث

سرطان پستان به عنوان یکی از انواع سرطان‌های پیشرو در تعدد موارد جدید تشخیصی بوده و به عنوان دومین عامل مرگ در بین سرطان‌های شایع می‌باشد (۱۸). یکی از مهمترین و بیشترین درمان‌هایی که امروزه برای سرطان‌ها در دسترس است، شیمی‌درمانی می‌باشد که اثرات جانبی جدی و تهدید کننده‌ای برای فرد دارد. از طرفی منجر به شکست درمان، مقاومت در برابر داروها، اثرات جانبی احتمالی و اثر بخشی محدود بر پیشرفت سلولهای سرطانی مقاوم به دارو می‌شود. کشف داروی جدید یک فرآیند طولانی و پرهزینه است که ممکن است ۱۵ تا ۲۰ سال طول بکشد و میلیاردها دلار هزینه در برداشته باشد. بنابراین رویکرد جامعه جهانی در جهت تولید داروهایی موثر، مقرون به صرفه و همچنین بکارگیری ابزارهای جدید در جهت انتقال دارو برای افزایش کارایی و کاهش اثرات جانبی آنهاست. در این میان، پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات طبیعی از ارگانسیم‌ها مانند سیانوباکتری‌ها دارای اثرات ضدسرطانی از طریق فعال نمودن مرگ سلولی آپوپتوز می‌باشد (۱۹). محیط زیست دریایی، منبع سرشار از فرآورده‌های طبیعی با کاربردهای درمانی گسترده بوده که مورد توجه بسیاری از محققان می‌باشد. به طوری که برخی از پتیدها و متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از این موجودات، تحت مراحل مختلف کارآزمایی‌های بالینی هستند. سیانوباکتریها به اشکال دریایی و به صورت عمومی به‌طور خاص سرشار از مواد فعال زیستی جدید (شامل توکسینها) برای کاربردهای دارویی و ضد تکثیری قوی علیه سلولهای سرطانی هستند (۲۰). در تحقیق حاضر، اثر غلظت‌های مختلف عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا بر روی رده سلولی سرطان پستان MCF-7 از نظر سمیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی زنده ماندن رده سلولی نشان داد که عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان واکنش باعث کاهش زنده ماندن سلول‌ها تحت تاثیر عصاره می‌شود. در واقع بین غلظت‌های مختلف عصاره اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در این تحقیق غلظت‌های مختلف عصاره پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج معنی‌داری آنها مشاهده شد. در طی ۲۴ ساعت مشاهده شد که غلظت ۵۰ میلی‌گرم بیشترین مهار را دارا بوده و در ۴۸ ساعت، رشد MCF-7 به‌طور محسوسی کاهش می‌یابد. پژوهش‌های دیگری تاثیر مهارکنندگی عصاره سیانوباکتر بر تکثیر سلول‌های سرطانی با القا مرگ سلولی آپوپتوز را گزارش نمودند و مشاهدات آنها نشان داد که فیکوسیاینین موجود در عصاره سیانوباکتری از طریق فعال نمودن پروتئین‌های کاسپاز در مسیر بیرونی آپوپتوز، مرگ سلولی را به راه می‌اندازند (۲۱). در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۱۴ انجام شد، Kyadari و همکاران نشان دادند گونه‌های *Lyngbya officinalis* و *Oscillatoria.sp* می‌توانند منجر به کاهش تکثیر سلول‌های

سرطانی دهانه رحم انسانی شوند. در گزارش آنها مقدار IC_{50} مربوط به *L. officinalis* و *Oscillatoria* برابر ۰/۲۶۰ و ۰/۲۲۰ به دست آمد بود که غلظت‌های مختلف آن عاملی موثر بر مهار سرطان بوده است (۲۲). همچنین بررسی اثرات سمیت عصاره *Oscillatoria terebriformis* بر روی رده سلولی سرطانی ریه A549 توسط Mukund در مدت زمان ۴۸ ساعت از زمان واکنش با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT انجام گرفت. در گزارش آن-ها مشخص شد که مقدار IC_{50} عصاره سیانوباکتری *Oscillatoria* بر روی رده سلولی، $0.980 \pm 14/67$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. بنابراین مهار تکثیر سلول‌های سرطانی به طور قابل توجهی با استفاده از عصاره سیانوباکتر به اثبات رسید (۲۳). یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر، با نتایج پژوهشگران فوق مطابقت دارد و وجود اختلاف ناچیز را می‌توان به غلظت و نوع عصاره‌های انتخاب شده که عامل تاثیرگذار در مهار سرطان دارد، مرتبط دانست. در این تحقیق، برای اولین بار ارزیابی کمی بیان ژن *Noxa* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا با استفاده از روش *real time PCR* در رده سلولی سرطان پستان نشان داد که بیان این ژن به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل افزایش می‌یابد. می‌توان پیشنهاد داد که اثرات مرگ سلولی عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا می‌تواند از طریق تنظیم بیان ژن *Noxa* اعمال شود. بنابراین افزایش بیان ژن *Noxa* و خاصیت القای مرگ سلولی را می‌توان به دلیل وجود ترکیبات ویژه در عصاره اسیلاتوریا نسبت داد. در این تحقیق علاوه بر ارزیابی بیان ژن، انجام تست فلوسایتومتری به منظور تایید میزان آپوپتوز و نکروز القاء شده توسط عصاره اسیلاتوریا انجام گرفت. در تست فلوسایتومتری از معرف انکسین ۵ برای تشخیص سلول‌های آپوپتوز شده و از پروپیوم یداید برای تشخیص سلول‌های نکروز شده استفاده شد. طی مرحله آپوپتوز براساس جابجایی فسفاتیدیل سرین از نیم لایه داخلی غشاء سلولی به نیم لایه خارجی آن معرف انکسین به آن متصل می‌شود. در تحقیق کنونی نتایج فلوسایتومتری نشان داد که عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا توانایی القاء مرگ سلولی آپوپتوز نسبت به نکروز در رده سلولی سرطان پستان را دارد که در گزارشات قبلی انجام نگرفته بود. از آنجا که مرگ سلولی از نوع نکروز با ایجاد التهاب در بافت تومور همراه است، بنابراین یافتن رویکردی جدید در جهت افزایش مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول‌ها یکی از راه‌های موثر در درمان سرطان به شمار می‌رود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق برای اولین بار اثرات آپوپتوزی و ضد سرطانی عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا در افزایش بیان ژن *Noxa* در رده سلولی سرطانی پستان MCF-7 نشان داده شد. بنابراین با توجه به

عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی سرطان، می‌تواند ارگان‌های دریایی مانند سیانوباکتری‌اسیلاتوریا را جهت مصرف منطقی ترکیبات این سیانوباکتری برای کمک درمانی انواع سرطان‌ها مورد مطالعه قرار داد و اثرات ضد سرطانی آنها را در مدل‌های حیوانی مورد ارزیابی قرار داد. همچنین ارزیابی بیان ژن‌های دیگر مسیر آپوپتوز و درک بیشتر مکانیسم اثر، در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. از این رو، پتانسیل بالقوه دارویی سیانوباکتری سزاوار توجه بیشتر در تحقیقات عملی و داروسازی می‌باشد که می‌تواند نامزد خوبی در زمینه‌های مختلف درمانی از جمله سرطان باشد.

قدردانی

مقاله حاضر استنتاج شده از داده‌های پایان‌نامه مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت با شماره ۱۱۷۳۰۵۰۶۰۹۴۲۰۱۳ می‌باشد. در ضمن از تلاش کارکنان شرکت دانش بنیان جاوید بیوتیک به‌خصوص جناب آقای دکتر عسگری کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، به علت عدم استفاده از نمونه‌های انسانی، ملاحظه اخلاقی وجود نداشت.

منابع مالی

این تحقیق با استفاده از امکانات آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد انجام گرفته است.

منافع متقابل

نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ح.رحمت‌اللهی و ع. سادات شاندیز طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه و همکاران نگارش مقاله را بر عهده داشتند. همچنین ع. صالح زاده نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید نموده‌اند.

References

- Shandiz SAS, Khosravani M, Mohammadi S, Noorbazargan H, Mirzaie A, Inanlou DN, et al. Evaluation of imatinib mesylate (Gleevec) on *KAI1/CD82* gene expression in breast cancer MCF-7 cells using quantitative real-time PCR. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; **6**(2): 159-163. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.10.006.
- Mathers C D, Shibuya K, Boschi-Pinto C, Lopez A D, Murray C J L. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: I. Application of regional cancer survival model to estimate cancer mortality distribution by site. *BMC Cancer* 2002; **2**: 36-63. doi: 10.1186/1471-2407-2-36.
- Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni S M, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: down staging without a formal screening program. *Ann Oncol* 2011; **22**(1): 93-97. doi: 10.1093/annonc/mdq303.
- Mousavi S M, Montazeri A, Mohagheghi M A, Jarrahi A M, Harirchi I, Najafi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; **13**(4): 383-391. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0632.
- Tabor M P, Brakenhoff R H, Ruijter-Schippers H J, Kummer J A, Leemans C R, Braakhuis B J. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin Cancer Res* 2004; **10**(11): 3607-3613. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0632.
- Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi K, Kondo T, Niwa Y, Yatsuya H, et al. Active smoking, passive smoking and breast cancer risk: findings from the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk. *J Epidemiol* 2008; **18**(2): 77-83. doi: 10.2188/jea.18.77.
- Cragg G M, Newman D J. Plants as a source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005; **100**(1-2): 72-79. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.011.
- Niwa T, Bradlow H L, Fishman J, Swaneck G E. Induction and inhibition of estradiol hydroxylase activities in MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Steroids* 1990; **55**(7): 297-302. doi: 10.1016/0039-128X(90)90032-7.
- Honardoos M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *JQUMS* 2013; **17**(3): 48-57. [Persian].
- Devarajan E, Sahin A A, Chen J S, Krishnamurthy R R, Aggarwal N, Brun A M, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemo resistance. *Oncogene* 2002; **21**(57): 8843-8851. doi: 10.1038/sj.onc.1206044.
- Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, et al. tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2002; **277**(14): 12237-12245. doi: 10.1074/jbc.M104893200.

12. Corbett T, Lowichik N, Pugh S, Polin L, Panchapor C, White K, et al. Antitumor activity of N-[[1-[[2 (diethyl amino)ethyl] amino]-9oxo-9H-Thioxanthen-4-yl]methylmethanesulfonamide (WIN33377) and analogs. *Exp Opin Invest Drugs* 2008; **3**(12): 1281-1292. doi: 10.1517/13543784.3.12.1281.
13. Luesch H, Moore R E, Paul V J, Mooberry S L, Corbett T H. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. *J Nat Prod* 2001; **64**(7): 907-910. doi: 10.1021/np010049y.
14. Xiong C, O'Keefe B R, Byrd R A, McMahon J B. Potent anti-HIV activity of scytovirin domain 1 peptide. *Peptides* 2006; **27**(7): 1668-1675. doi: 10.1016/j.peptides.2006.03.018.
15. Ha J H, Hidaka T, Tsuno H. Quantification of toxic *Microcystis* and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environ Sci & Technol* 2009; **43**(3): 812-818. doi: 10.1021/es801265f.
16. Namiki M. Antioxidants antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; **29**(4): 273-300. doi: 10.1080/10408399009527528.
17. Grindberg R V, Shuman C F, Sorrels C M, Wingerd J, Gerwick W H. *Neurotoxic Alkaloids from Cyanobacteria. In Modern Alkaloids, Structure, Isolation, Synthesis and Biology*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, Germany, 2008; 139-170. doi: 10.1002/9783527621071.ch6.
18. Tripathi A, Fang W, Leong D T, Tan L T. Biochemical studies of the lagunamides, potent cytotoxic cyclic depsipeptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Marine drugs* 2012; **10**(5): 1126-1137. doi: 10.3390/md10051126.
19. Bajpai R, Sharma N K, Rai A K. Usha Hepatosplenomegaly and phytotoxicity of a planktonic cyanobacterium *Nostoc* sp. BHU001 isolated from agricultural pond, *World J Microbiol Biotechnol* 2009; **25**(11): 1995-2003. doi: 10.1007/s11274-009-0100-9.
20. Fleming L E, McDonough N, Austen M, Mee L, Moore M, Hess P, et al. Oceans and Human Health: A rising tide of challenges and opportunities for Europe. *Marine Environmental Res* 2014; **99**(3): 16-19. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.05.010.
21. Wang H, Liu Y, Gao X, Carter Ch, Liu Z. The recombinant b subunit of C-phycoerythrin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Letters* 2007; **247**(1): 150-158. doi: 10.1016/j.canlet.2006.04.002.
22. Kyadari M, Fatma T, Velpandian T, Malliga P, Bharat N, Bano F. Antiangiogenic and anti-proliferative assessment of cyanobacteria. *Indian J Exp Biol* 2014; **52**(8): 835-842.
23. Mukund S, Sivasubramanian V. Anticancer Activity of *Oscillatoria Terebriformis* Cyanobacteria in Human Lung Cancer Cell Line A549. *Int J Applied Biol Pharmaceutical Technol* 2014; **5**(2): 34-45.

Original Article

Comparison of simplified acute physiology score iii and sequential organ failure assessment on detection prognosis of mortality in non-traumatic patients who admitted to the intensive care unit abstract

Hamidreza Shetabi¹ , Parviz Kashefi¹ , Parnian Zolfaghari^{2*} 

¹Anesthesiology and Critical Care Research Center, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

²Student's Research Committee, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

*Corresponding author; E-mail: zolfaghari_p90@yahoo.com

Received: 13 November 2018 Accepted: 16 December 2018 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):65-71

Abstract

Background: There are different scoring systems to determine the mortality rate of patients to intensive care unit (ICU), the aim of this study was to compare the Simplified Acute Physiology Score (SAPS) III and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) tests in determining the degree of mortality in non-traumatic patients who admitted to the intensive care unit (ICU).

Methods: In this retrospective cross-sectional study, mortality rate was assessed with using of SOFA and SAPS III scorings on 100 non traumatic patients who admitted to the ICU according to the inclusion and exclusion criteria. The patients were also divided into two groups based on mortality and were included survive and non-survive groups.

Results: The mean SOFA score in survived and non-survived groups were 2.03 ± 1.96 and 5.42 ± 3.84 respectively, and for SAPS III, were 30.76 ± 8.17 and 55.38 ± 15.47 respectively. The SOFA and SAPS III scores in the non-survived group was significantly higher than survived group ($P < 0.0001$ for both tests). The sensitivities, specificities, positive predictive value and negative predictive value were 79/75%, 85/71%, 95/5%, 52/9% for the SAPSII score, respectively and 91/14%, 57/14%, 88/9%, 63/2% for the SOFA Scoring system, respectively.

Conclusion: SAPS III was a better prognostic score in determining of mortality.

Keyword: Mortality, SOFA, SAPSIII, Intensive Care Unit, non-traumatic.

How to cite this article: Shetabi H, Kashefi P, Zolfaghari P. [Comparison of simplified acute physiology score iii and sequential organ failure assessment on detection prognosis of mortality in non-traumatic patients who admitted to the intensive care unit abstract]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):65-71. Persian.

مقاله پژوهشی

مقایسه دو سیستم امتیازبندی SOFA و SAPS III در پیش‌بینی مورتالیتی بیماران غیر ترومایی بستری در بخش مراقبت‌های ویژه

حمیدرضا شتابی^۱، پرویز کاشفی^۱، پرنیان ذوالفقاری^{۲*}

^۱ مرکز تحقیقات بیهوشی و مراقبت‌های ویژه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۲ کمیته تحقیقات دانشجویی گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
* نویسنده مسوول: ایمیل: zolfaghari_p90@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۵ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۶۵-۷۱

چکیده

زمینه: امروزه سیستم‌های امتیازبندی زیادی برای تعیین میزان مورتالیتی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر مقایسه دو سیستم امتیازبندی Simplified Acute Physiology Score (SAPS) III و Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) در تعیین میزان مورتالیتی بیماران غیر ترومایی بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه مقطعی توصیفی گذشته‌نگر، میزان مرگ و میر ۱۰۰ بیمار غیر ترومایی بستری شده در ICU با توجه به معیارهای ورود و خروج مطالعه با استفاده از دو سیستم امتیازبندی SOFA و SAPS III اندازه‌گیری شد. همچنین بیماران بر اساس مرگ و میر به دو گروه زنده مانده و فوت شده تقسیم شدند.

یافته‌ها: میانگین امتیاز ابزار SAPS III در بیماران زنده مانده و فوت شده به ترتیب برابر با $30/67 \pm 8/17$ و $55/38 \pm 15/47$ و میانگین امتیاز ابزار SOFA در بیماران زنده مانده و فوت شده به ترتیب $1/96 \pm 2/03$ و $5/42 \pm 3/84$ بوده است. میزان نمرات SOFA و SAPS III در گروه فوت شده بطور معنی‌داری بالاتر از گروه زنده بود ($P > 0/0001$) برای هر دو سیستم امتیازبندی. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی برای سیستم امتیازبندی SAPS III به ترتیب $0/79$ ، $0/85$ ، $0/95$ و $0/52$ و برای SOFA، $0/91$ ، $0/57$ ، $0/88$ و $0/63$ می‌باشد.

نتیجه‌گیری: سیستم امتیازبندی SAPS III معیار خوبی برای پیش‌بینی پیش‌آگهی مرگ و میر بیماران غیر ترومایی بستری در بخش ICU می‌باشد.

کلید واژه‌ها: مورتالیتی، SAPS III، SOFA، بخش مراقبت‌های ویژه، غیر ترومایی

نحوه استناد به این مقاله: شتابی ح م، کاشفی پ، ذوالفقاری پ. مقایسه دو سیستم امتیازبندی SOFA و SAPS III در پیش‌بینی مورتالیتی بیماران غیر ترومایی بستری در بخش مراقبت‌های ویژه. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۶۵-۷۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

بخش مراقبت‌های ویژه از جمله مهم‌ترین بخش‌های بیمارستانی به شمار می‌رود (۱). با توجه به محدودیت‌های انسانی و همچنین تخت‌های بستری و در مقابل ضرورت مراقبت بیماران بدحال و کاهش مورتالیتی معیارهایی با مقیاس‌های اندازه‌گیری جهت سهولت کار تعیین گردیده است (۲).

توسعه سریع ICU (intensive care unit) مستلزم یک سیستم ارزیابی بر اساس یافته‌های کمی بالینی برای ارزیابی تاثیر درمان یا پیش‌آگهی بیماران مختلف می‌باشد. در یک مرکز ICU بیمارانی با علل مختلف فیزیولوژیک و با بیماری‌های مختلفی بستری شده‌اند. تعیین پیش‌آگهی و مقایسه گروه‌های مختلف بیماران به منظور درمان، تعیین اولویت یا مقایسه‌های آماری بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) همواره چالشی جدی به حساب می‌آمد که در نتیجه سیستم‌های امتیازدهی برای مقایسه پیش‌آگهی و Out come بیماران بستری در ICU ایجاد شدند (۲). پیش‌آگهی بیماران بستری در ICU، به فاکتورهای زیادی از جمله شرایط بیمار در روز اول بستری در ICU و همچنین به فاکتورهایی در طول بستری در ICU وابسته است. بدین منظور تاکنون سیستم‌های امتیازدهی مختلفی پدید آمده‌اند. سیستم‌های امتیازدهی توانسته‌اند نقش مهمی در پیگیری درمان و در نتیجه کاهش هزینه‌های بیمارستانی و دستیابی به استانداردهای درمان ایفا کنند (۳).

به طور کلی متغیرهای تاثیرگذار در مرگ و میر در ۵ گروه دسته‌بندی می‌شوند: سن، بیماری‌های همراه، اختلالات فیزیولوژیک، تشخیص حاد و مداخلات (۲).

در سال ۱۹۸۴ سیستم امتیازبندی SAPS (Simplified Acute Physiology Score) برای اولین بار به عنوان جایگزینی برای APACHE (Physiology And Chronic Health Evaluation) منتشر شد.

امتیاز اصلی در این سیستم در ۲۴ ساعت اول بستری در ICU توسط ارزیابی ۱۴ پارامتر فیزیولوژیک، بدون در نظر گرفتن بیماری‌های قبلی، به دست می‌آید. اکنون این سیستم امتیازبندی توسط دو سیستم SAPS II و SAPS III که با ارزیابی ۱۲ پارامتر فیزیولوژیک در ۲۴ ساعت اول بستری به همراه در نظر گرفتن سن بیمار و وضعیت سلامت قبلی به پیش‌بینی مورتالیتی بیمار می‌پردازند، جایگزین شده است (۲).

مدل‌های پیش‌بینی کننده APACH II و SAPS II بیشترین سیستم‌های امتیازبندی مورد استفاده برای بیماران بستری شده در ICU هستند. در سال ۲۰۰۵، مدل SAPS III پیشنهاد گردید که در درجه اول با دو مدل سابق، در جمع‌آوری داده‌ها در ساعت اول پذیرش در ICU، به جای ۲۴ ساعت اول، تفاوت دارد. نزدیک به نیمی از قدرت پیش‌بینی کننده SAPS III بر اساس اطلاعات قبل از پذیرش بیمار در ICU می‌باشد که آن را به یک ابزار بالقوه برای

تریاز در ICU تبدیل کرده است. سیستم امتیازبندی SAPS III شامل ۲۰ متغیر می‌باشد و شامل دو بخش است: SAPS III admission score و SAPS III probability of death at hospital discharge.

متغیرهای سیستم SAPS III شامل: سن، مدت اقامت در بیمارستان قبل از پذیرش ICU، موقعیت بیمار درون بیمارستان (OR, ER, Other ICU, Other)، بیماری‌های همراه (شامل درمان سرطان، سرطان، AIDS، Chronic HF، سیروز)، مصرف داروهای وازواکتیو قبل از پذیرش ICU، نحوه ورود به ICU (برنامه‌ریزی شده، برنامه‌ریزی نشده)، علت بستری در ICU (قلبی عروقی، کبدی، گوارشی، نورولوژیک)، وضعیت جراحی بیمار در زمان پذیرش (جراحی برنامه‌ریزی شده، جراحی اورژانسی، بدون جراحی)، محل جراحی (پیوند، تروما، جراحی قلب، جراحی اعصاب)، عفونت حاد در زمان پذیرش ICU (بیمارستانی، تنفسی)، GCS، بیشترین مقدار بیلی‌روبین توتال، بیشترین مقدار درجه حرارت بدن، بیشترین مقدار کراتینین، بیشترین میزان ضربان قلب، کمترین میزان WBC، کمترین میزان PH، کمترین میزان پلاکت، کمترین میزان SBP، وجود Mechanical ventilation یا CPAP و PaO2/FiO2 (۵ و ۶).

SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) به منظور ارزیابی بروز و شدت نارسایی ارگان‌های بدن در بیماران بد حال استفاده می‌شود که به پیش‌بینی outcome بیماران کمک می‌کند (۷). سیستم SOFA بر اساس شش زیر مجموعه شامل علائم تنفسی، قلبی عروقی، CNS، کلیوی، کبدی و انعقادی می‌باشد که هر کدام از ۰ (نرمال) تا ۴ (نارسایی شدید/اختلال عملکرد شدید) امتیازبندی می‌شوند و نمره نهایی از ۰ تا ۲۴ می‌باشد. که امتیاز صفر تا ۶ مورتالیتی کمتر از ۱۰٪، امتیاز ۷ تا ۹ مورتالیتی ۱۵ تا ۲۰٪، امتیاز ۱۰ تا ۱۲ مورتالیتی ۴۰ تا ۵۰٪، امتیاز ۱۳ تا ۱۴ مورتالیتی ۵۰ تا ۶۰٪، امتیاز ۱۵ مورتالیتی بالای ۸۰٪ و امتیاز ۱۵ تا ۲۴ مورتالیتی بالای ۹۰٪ را پیش‌بینی می‌کند (۷).

تاکنون مطالعات مختلفی جهت ارزیابی معیارهای تاثیرگذار در شدت بیماری و مورتالیتی در بیماران مختلف انجام شده است، اما نقش دو سیستم امتیازبندی SAPS III و SOFA در تعیین میزان مرگ و میر بیماران غیر ترومایی متفاوت بیان شده است. در این مطالعه هدف ما تعیین کارایی دو سیستم امتیازدهی SOFA و SAPS III در پیش‌بینی مورتالیتی بیماران غیر ترومایی پذیرش شده در ICU می‌باشد.

روش کار

این مطالعه یک مطالعه مشاهده‌ای، توصیفی - تحلیلی، مقطعی است که در سال ۱۳۹۵ در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان

الزهراس) اصفهان انجام گرفته است. جامعه آماری مورد مطالعه، پرونده بیماران غیر ترومایی موجود در بایگانی بخش فوق از سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ بود. معیار ورود در این مطالعه بیمارانی بودند که به علت‌هایی غیر از علل ترومایی در بخش فوق بستری شده‌اند. معیارهای خروج از این مطالعه عبارت بودند از: بیمارانی که قبل از بستری در ICU تحت دیالیز قرار گرفته‌اند (به دلیل تغییر دادن فاکتورهای فیزیولوژیک)، بیمارانی که کمتر از ۲۴ ساعت در ICU بستری بوده‌اند، بیمارانی که پرونده‌ی آنها ناقص یا مخدوش می‌باشد، بیمارانی که سن کمتر از ۱۶ سال دارند و بیمارانی که به علت سوختگی بستری شده‌اند. همچنین با توجه به وجود داشتن محدودیت‌هایی از جمله نقص در پرونده‌ها، تعدادی دیگر از بیماران حذف شدند. نمونه‌گیری به روش تصادفی و با استفاده از جدول اعداد تصادفی (ایجاد شده توسط رایانه) بوده است.

بعد از مشخص شدن بیماران مورد مطالعه، اطلاعات بیماران شامل: اطلاعات قبل از پذیرش در ICU، اطلاعات دموگرافیک و بالینی، تهویه مکانیکی، فشار خون سیستولی و میانگین شریانی (mmHg)، ضربان قلب، درجه حرارت بدن، Glasgow Coma Scale یا GCS، آنالیز گازهای شریانی (PH, PaO₂, FiO₂)، نتایج آزمایشگاهی (تعداد گلبول‌های سفید، میزان پلاکت و سطح سرمی کراتینین و بیلی‌روبین توتال) و مقدار داروهای وازوپرسور مصرفی به طور جامع از پرونده بیمار جهت محاسبه SAPSIII و SOFA استخراج گردید. قابل ذکر است امتیاز SAPS طبق نسخه ۲۰۰۵ (شامل ۲۰ متغیر و از ۰ تا ۲۱۷ براساس شدت بیماری نمره‌بندی می‌شود به این صورت که با شدت بیماری رابطه مستقیم دارد) برای هر بیمار توسط نرم‌افزار آماری که تحت اکسل عمل می‌کند، به دست آمد. این نرم‌افزار از مجموعه‌ای از فرمول‌های پیچیده آماری استفاده می‌کند که بعد از لحاظ کردن مجموعه ضرایب تصحیح که برای هر پارامتر بالینی یا آزمایشگاهی در نظر گرفته شده است، امتیاز SAPS را برای هر بیمار محاسبه می‌کند و بعد از وارد کردن داده‌های خام بالینی و آزمایشگاهی به صورت خودکار محاسبات مذکور، انجام می‌گیرد. همچنین نمره SOFA با استفاده از نرم‌افزار محاسبه کننده SOFA واقع در سایت Clinical.com محاسبه شد. پس از جمع‌آوری کامل داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از SPSS ۲۰ و medcalc استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون T مستقل (independent T test)، همبستگی پیرسون (pearson correlation) منحنی ROC و در صورت نیاز آنالیز رگرسیون استفاده شد و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۱۰۰ نفر از بیماران غیر ترومایی بستری در بخش مراقب‌های ویژه بیمارستان الزهرای اصفهان انجام شد که

شامل ۵۶٪ مرد و ۴۴٪ زن بوده که ۲۱ درصد از این افراد فوت شده‌اند. طیف سنی بیماران از ۱۶ تا ۹۰ سال با میانگین $57/18 \pm 57/61$ بوده است. یافته‌ها در جدول ۱ نشان داد که پیامد (زنده مانده- فوت شده) در دو جنس زن و مرد تفاوت معناداری نداشت. در صورتی که با افزایش سن اختلاف معنادار بود. همچنین متوسط روزهای بستری بیماران در گروه فوت شده به طور معناداری بیشتر از گروه زنده مانده گزارش شده است. علاوه بر آن نتایج آزمون کای اسکوتر نشان داد بین میزان مرگ و میر و استفاده از تهویه مکانیکی ارتباط معناداری وجود دارد به طوری که میزان مرگ و میر در بیماران استفاده کننده از تهویه ۱۹٪ بوده در حالی که در بیمارانی که از تهویه مکانیکی استفاده نکرده بودند این میزان ۲٪ گزارش شده است (جدول ۱). میزان مرگ و میر در رده سنی زیر ۲۵ سال ۰٪، ۲۵-۵۰ سال ۳٪، ۵۰-۷۰ سال ۱۲٪ و بالای ۷۵ سال ۶٪ بوده است. ۱۲٪ از فوت شده‌ها مرد و ۹٪ زن بوده‌اند. میانگین امتیاز ابزار SOFA در بیماران زنده مانده و فوت شده به ترتیب $1/96 \pm 2/03$ و $5/42 \pm 3/84$ بوده است که این اختلاف با $P = 0.001$ معنادار نشان داده شد. همچنین میانگین امتیاز ابزار SAPSIII در بیماران زنده مانده و فوت شده به ترتیب برابر با $30/67 \pm 8/17$ و $55/38 \pm 15/47$ بود و این اختلاف معنادار شناخته شد ($P < 0.0001$). به دلیل اینکه امتیاز ابزارهای SOFA و SAPSIII در بیماران زنده مانده و فوت شده به طور معناداری با یکدیگر متفاوت بود، تحلیل منحنی ROC به جهت تعیین قدرت پیش‌بینی مرگ و میر بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه در این دو ابزار مورد استفاده قرار گرفت.

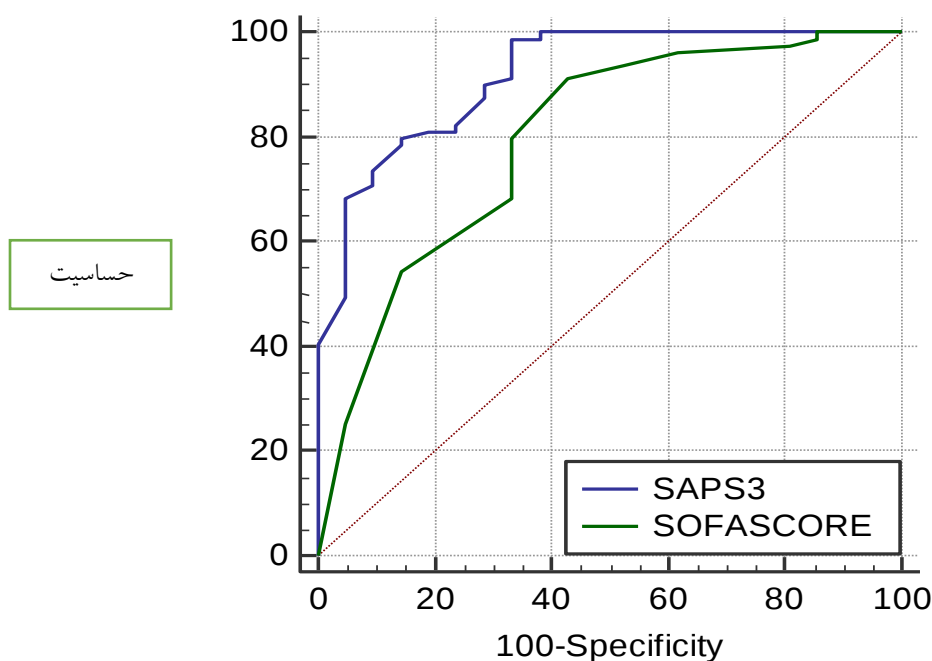
منحنی ROC در ابزار SOFA با سطح زیر منحنی برابر با ۰/۷۹۵ و فاصله اطمینان ۰/۹۵٪ برابر با (۰/۷۰۲-۰/۸۶۹) با نقطه برش ۰/۵ تعیین شد که به طور معنی‌داری از منحنی شانس متفاوت بود ($P < 0.0001$). تجزیه و تحلیل شاخص‌های این منحنی به قرار زیر می‌باشد: حساسیت ۰/۹۱/۱۴٪، ویژگی ۰/۵۷/۱۴٪، ارزش اخباری مثبت ۰/۸۸/۹٪ و ارزش اخباری منفی ۰/۶۳/۲٪. این نتایج نشان می‌دهد ابزار فوق می‌تواند با احتمال ۰/۸۸/۹٪ بیماران فوت شده را تشخیص داده و همچنین با احتمال ۰/۶۳/۲٪ افراد زنده مانده را تایید کند. تجزیه و تحلیل منحنی ROC برای ابزار SAPSIII به صورت زیر است: سطح زیر منحنی برابر با ۰/۹۱۷/۰ و فاصله اطمینان ۰/۹۵٪ (۰/۸۴۵-۰/۹۶۳) و نقطه برش ۰/۵ بود که از منحنی شانس به طور معنی‌داری اختلاف داشت ($P < 0.0001$). حساسیت و ویژگی ابزار SAPS III در پیشگویی مرگ و میر بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه به ترتیب ۰/۷۹/۷۵٪ و ۰/۸۵/۷۱٪ بود و ارزش اخباری مثبت ۰/۹۵/۵٪ و ارزش اخباری منفی ۰/۵۲/۹٪ گزارش شد. با توجه به این نتایج این ابزار می‌تواند با احتمال ۰/۹۵/۵٪ بیماران فوت شده را تایید کرده و با احتمال ۰/۵۲/۹٪ افراد زنده مانده را تشخیص دهد. نمودار ۱ دو ابزار SOFA و SAPS

III را با یکدیگر مقایسه کرده و نشان می‌دهد با توجه به این که ابزار SAPS III سطح زیر منحنی بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد نسبت به ابزار SOFA دارای قدرت پیشگویی بالاتری در مرگ و میر این بیماران می‌باشد. نتایج همبستگی اسپیرمن رابطه مثبت و معنی‌داری بین متوسط امتیاز ابزارهای SOFA و SAPS III

و مرگ و میر بیماران نشان داد به طوری که برای هر دو ابزار $P < 0.0001$ تعیین شد (جدول ۲). همچنین نتایج ارتباط بین متوسط امتیاز SOFA و SAPS III با مدت زمان بستری در ICU و استفاده / عدم استفاده از تهویه مکانیکی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: توزیع فراوانی بیماران در دو گروه زنده مانده و فوت شده برحسب سن و جنس و روزهای بستری و استفاده/عدم استفاده از تهویه مکانیکی

ردیف	متغیرها	زنده مانده (n=۷۹)	فوت شده (n=۲۱)	P-value
۱	سن (میانگین $\pm$ انحراف معیار) (سال)	۵۳/۱۸ $\pm$ ۵۸/۳۵	۶۶/۱۶ $\pm$ ۲۳/۱۳	*./۰.۳۴
۲	جنس			
	تعداد مرد (درصد)	(۴۴)۴۴	(۱۲)۱۲	**./906
	تعداد زن (درصد)	(۳۵)۳۵	(۸)۸	
۳	متوسط روزهای بستری در آی سی یو	۵/۳۷ (۴/۴۳)	۱۳/۰۹ (۱۲/۷۳)	*./002
۴	تهویه مکانیکی			**<0/0001
	تعداد افراد استفاده کرده (درصد)	(۵)۵	(۱۹)۱۹	
	تعداد افراد استفاده نکرده (درصد)	(۷۴)۷۴	(۲)۲	



نمودار ۱: مقایسه دو منحنی ROC در امتیاز ابزارهای SOFA و SAPSIII

جدول ۲: رابطه بین امتیازات SOFA و SAPS III با میزان مرگ و میر، مدت بستری و استفاده/عدم استفاده از تهویه مکانیکی

متغیر	امتیاز SOFA	امتیاز SAPS III
	ضریب همبستگی	ضریب همبستگی
مرگ و میر استفاده از تهویه مکانیکی مدت زمان بستری	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
	۰/۴۲۲	۰/۵۸۹
	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
	۰/۳۶۲	۰/۵۲۵
	$P = 0.016$	$P = 0.020$
	۰/۲۴۱	۰/۲۳۲

بحث

بیماران بستری در ICU ذکر کرد. ولی نشان دادن که دقت و کالیبراسیون SOFA کمی بهتر از APACHE II می باشد و به دلیل سادگی محاسبه، به عنوان سیستم امتیازبندی انتخابی در پیش بینی Outcome بیماران ICU توصیه گردید (۱۳). همچنین مطالعه‌ای که در همین مرکز در سال ۹۴ جهت مقایسه دو سیستم SOFA و SAPS III در ۱۰۰ بیمار ترومایی بستری شده بخش مراقبت‌های ویژه انجام شد به این نتیجه رسید که هر دو سیستم امتیازبندی SOFA و SAPS III معیارهای خوبی برای نمره‌بندی پیش‌آگهی مرگ و میر بیماران ترومایی بستری در بخش ICU می باشد. اما راحتی و سادگی سیستم امتیازبندی SOFA در تعیین مورتالیتی بیشتر می باشد (۱۴).

نتیجه‌گیری

به صورت کلی با توجه به محدود بودن منابع و همچنین تخت‌های بخش مراقبت‌های ویژه در کشور و مخصوصاً بیمارستان الزهرا اصفهان، امتیازدهی بیماران به بیماران پذیرش شده در بخش مراقبت‌های ویژه از اهمیت قابل توجهی برخوردار است که این امتیازدهی باید به بهترین نحو و با استفاده از بهترین سیستم‌ها صورت گیرد که طبق بحث‌های انجام شده، استفاده از سیستم SAPS III نسبت به SOFA دارای ارجحیت می باشد. همچنین امید بر این است که مطالعه‌ی حاضر بتواند راهگشای مطالعات بیشتر و بررسی‌های جامع‌تر در خصوص سیستم‌های امتیازدهی و تلفیق آن‌ها باشد.

قدردانی

از کلیه دست اندر کاران و شرکت کنندگان در این پژوهش تشکر و قدردانی بعمل می آید. این پژوهش برگرفته از پایان نامه دکتری حرفه‌ای پزشکی پرینان ذوالفقاری به شماره ۳۹۵۸۲۹ و با حمایت‌های مادی و معنوی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام یافته است.

ملاحظات اخلاقی

شامل نمی شود.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرنت ۳۹۵۸۲۹ از طرف معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

مؤلفان اظهار می دارند که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارد.

در این مطالعه ۱۰۰ بیمار بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه تحت بررسی و امتیازدهی بر اساس هر دو سیستم SOFA و SAPS III قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی ما موید آن است که سیستم امتیازدهی SAPS III در تشخیص بیمارانی که فوت شده‌اند (ارزش اخباری مثبت) دارای دقت ۹۵/۵٪ و سیستم امتیازدهی SOFA دارای دقت ۸۷/۹٪ در تشخیص همین بیماران بوده است و بنابراین در پیش‌بینی مورتالیتی ابزار ارزشمندتری می باشد و نسبت به سیستم SOFA دارای ارجحیت است.

Chunsheng (۸) در مطالعه‌ای به بررسی قدرت پیش‌بینی پیش‌آگهی APACHE II, SOFA, SAPS II, SAPS III و MEDS در ۶۷۷ بیمار مبتلا به سپسیس شدید بستری در ICU با سن بیشتر از ۱۸ سال و survival بیشتر از ۲۴ ساعت پرداخت. میزان مورتالیتی ۴۱/۹٪ بود و در مقایسه گروه زنده مانده با فوت شده مشخص شد که بیماران فوت شده، سن بالاتر به همراه امتیاز بالاتر (برای همه $P < 0.001$). تفاوت قابلیت پیش‌بینی سیستم SAPS III در مقایسه با دیگر سیستم‌ها در بیماران بستری شده در ICU با سپسیس شدید، قابل توجه بود که این نتایج با نتایج مطالعه‌ی ما همخوانی داشته است. ولی برای پیش‌آگهی بیماران با سپسیس حاد، ارجحیتی نسبت به سایر سیستم‌ها ندارد. همچنین Sawicka و همکاران در مطالعه که در سال ۲۰۱۴ در لهستان انجام دادند جهت بررسی قدرت پیش‌بینی پیش‌آگهی APACHE II, SOFA, SAPS II در ۹۹ بیمار پذیرش شده در ICU با بدخیمی خونی، به این نتیجه رسیدند که SAPS II ابزار پیش‌بینی کننده بهتری می باشد (۹). مطالعه‌ای دیگر جهت ارزیابی پیش‌بینی مورتالیتی سه سیستم امتیازبندی APACHE II, SOFA, SAPS II روی ۱۴۹ بیمار که دچار مسمومیت با ارگانوفسفره شده بودند طی سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۱۲ نشان داد که سیستم امتیازبندی SOFA در پیش‌بینی مورتالیتی مفیدتر بوده و همچنین استفاده از آن نسبت به دو سیستم دیگر آسان‌تر می باشد که این نتیجه برخلاف نتیجه مطالعه ما بوده است (۱۰). مطالعه Nair (۱۱) که به مقایسه دو سیستم امتیازبندی SOFA و SAPS در ۴۸ بیمار عفونی بستری در بخش مراقبت‌های ویژه پرداخت، نشان داد که سیستم امتیازبندی SOFA در تعیین مورتالیتی قابل پیش‌بینی در بیماران عفونی بهتر است و این سیستم امتیازبندی آسان به منظور اندازه‌گیری برای نارسایی ارگان در بیماری‌های عفونی مناسب است. همچنین در این مطالعه سیستم امتیازبندی SOFA از ویژگی و حساسیت خوبی برخوردار بود ولی سیستم امتیازبندی SAPS حساسیت پایینی داشت. Turanzas و همکاران (۱۲) که به بررسی سیستم امتیازبندی SOFA بروی پیش‌بینی میزان مرگ و میر در بیماران سرطانی بستری شده در ICU پرداخته بودند، به این نتیجه رسیدند که سیستم امتیازبندی SOFA معیار خوبی برای تبعیض مورتالیتی در بیماران بستری در ICU و بیمارستان می باشد. مطالعه‌ای دیگر دو سیستم امتیازبندی SOFA و APACHE II را دو معیار خوب برای پیش‌بینی نتیجه

مشارکت مؤلفان

ح. ش، پ. ک. و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج

مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مقاله را تألیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تأیید کرده‌اند.

References

- Herridge M S. Prognostication and intensive care unit outcome: the evolving role of scoring systems. *Clinics in chest medicine* 2003; **24**(4): 751-762. doi: 10.1016/S0272-5231(03)00094-7
- Bouch D C, Thompson J P. Severity scoring systems in the critically ill. *Continuing education in anaesthesia critical care & pain* 2008; **8**(5): 181-185. doi: 10.1093/bjaceaccp/mkn033
- Rapsang A G, Shyam D C. Scoring systems in the intensive care unit: a compendium. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of indian society of critical care medicine* 2014; **18**(4): 220. doi: 10.4103/0972-5229.130573
- Metnitz P G, Moreno R P, Almeida E, Jordan B, Bauer P, Campos R A, et al. SAPS 3--From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 1: Objectives, methods and cohort description. *Intensive care medicine* 2005; **31**(10): 1336-1344. doi: 10.1007/s00134-005-2762-6
- Haq A, Patil S, Parcels A L, Chamberlain R S. The simplified acute physiology score III is superior to the simplified acute physiology score II and acute physiology and chronic health evaluation II in predicting surgical and ICU mortality in the "oldest old". *Current gerontology and geriatrics research* 2014; **2014**. doi: 10.1155/2014/934852
- Ferreira F L, Bota D P, Bross A, Mélot C, Vincent J-L. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *Jama* 2001; **286**(14): 1754-1758. doi:10.1001/jama.286.14.1754
- Li Y, Li C. Comparison of simplified acute physiology score III and other scoring systems in prediction of 28-day prognosis in patients with severe sepsis. *Zhonghua wei zhong bing ji jiu yi xue* 2015; **27**(6): 454-459. doi: 10.1186/s13054-015-0768-1
- Sawicka W, Owczuk R, Wujtewicz M A, Wujtewicz M. The effectiveness of the APACHE II, SAPS II and SOFA prognostic scoring systems in patients with haematological malignancies in the intensive care unit. *Anaesthesiology intensive therapy* 2014; **46**(3): 166-170. doi: 10.5603/AIT.2014.0030
- Kim Y H, Yeo J H, Kang M J, Lee J H, Cho K W, Hwang S, et al. Performance assessment of the SOFA, APACHE II scoring system, and SAPS II in intensive care unit organophosphate poisoned patients. *Journal of Korean medical science* 2013; **28**(12): 1822-1826. doi: 10.3346/jkms.2013.28.12.1822
- Nair R, Bhandary N M, D'Souza A D. Initial Sequential Organ Failure Assessment score versus Simplified Acute Physiology score to analyze multiple organ dysfunction in infectious diseases in Intensive Care Unit. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine* 2016; **20**(4): 210. doi: 10.4103/0972-5229.180041
- Cárdenas-Turanzas M, Ensor J, Wakefield C, Zhang K, Wallace S K, Price K J, et al. Cross-validation of a Sequential Organ Failure Assessment score-based model to predict mortality in patients with cancer admitted to the intensive care unit. *Journal of critical care* 2012; **27**(6): 673-680. doi: 10.1016/j.jcrc.2012.04.018
- Hosseini M, Ramazani J. Evaluation of Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II and sequential organ failure assessment scoring systems for prognostication of outcomes among Intensive Care Unit's patients. *Saudi journal of anaesthesia* 2016; **10**(2): 168. doi: 10.4103/1658-354X.168817
- Kashefi P, Abbasian Z, Abbasi S, Saghaei M. Comparison of Simplified Acute Physiology Score III and Sequential Organ Failure Assessment on Detection Prognosis of Mortality in Patients with Trauma Admitted to the Intensive Care Units of Alzahra Hospital, Isfahan, Iran, in 2015. *Jornal of isfahan medical school* 2018; **455**: 1620-1625. doi: 10.22122/jims.v35i455.8764

Original Article

A comparative survey on effect of nanoparticles and microparticles of Chitosan on *Cryptosporidium parvum* experimental infection in mice.

Parisa Shahbazi^{*}, Ahmad Nematollahi, Ali Haghi, Amir Ali Shahbazfar, Katayoon Nofuzi

Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

^{*}Corresponding author; E-mail: p.shahbazi56@gmail.com

Received: 8 August 2017 Accepted: 4 November 2017 First Published online: 20 May 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):72-80

Abstract

Background: The inhibitory effect of Nanoparticles and microparticles of Chitosan on infection due to *Cryptosporidium* was studied.

Methods: For this purpose 30 NMRI mice with 4-6 weeks old were randomly divided into five groups including, uninfected /untreated control group, infected/untreated control group, infected/ treated with chitosan (0.5 mg in per approve), infected/ treated with nano chitosan (0.5 mg in per approve) and infected/ treated with nano chitosan (1 mg in per approve). Except first group, mice were experimentally infected by oral administration of 10^4 *C. parvum* oocysts for per animal. Treatment groups were administered with nano chitosan and micro particles of chitosan. The presence of oocyst shedding, weight gain/loss, the histopathology of intestine sections and serology were examined in all groups.

Results: There was no significant difference between the mean of weight gain/loss in control and treatment groups. Oocyst shedding was significantly ($p < 0.05$) reduced in treatment groups; in spite of more reduction in oocyst shedding in use of nano chitosan but no significant difference ($p \leq 0.05$) between the treatment with chitosan and nano chitosan was seen. In the HI test was also significant difference ($p \leq 0.05$) between the treatment and control groups. Histopathological analysis of intestine sections further not supported the clinical and parasitological findings.

Conclusion: The nano chitosan and chitosan were effective against experimentally infection with *Cryptosporidium parvum* in mice; therefore can be used as a treatment for cryptosporidiosis.

Keyword: Chitosan, *Cryptosporidium parvum*, Mice, Microparticles, Nanoparticles.

How to cite this article: Shahbazi P, Nematollahi A, Haghi A, Shahbazfar A A, Nofuzi K. [A comparative survey on effect of nanoparticles and microparticles of Chitosan on *Cryptosporidium parvum* experimental infection in mice.]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):72-80. Persian.

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر نانوذرات و میکروذرات کیتوزان بر آلودگی تجربی به کریپتوسپورییدیوم پارووم در موش سوری

پریسا شهبازی^{ID*}، احمد نعمت الهی^{ID}، علی حقی^{ID}، امیر علی شهبازفر^{ID}، کتابیون نفوذی^{ID}گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول: ایمیل p.shahbazi56@gmail.comدریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۷۲-۸۰

چکیده

زمینه: در این مطالعه اثر ممانعت کنندگی نانوذرات و میکروذرات کیتوزان بر عفونت کریپتوسپورییدیایی بررسی شد.

روش کار: تعداد ۳۰ سر موش سوری نژاد NMRI، ۴-۶ هفته به ۵ گروه شامل گروه شاهد بدون آلودگی و بدون درمان، گروه شاهد آلوده بدون درمان، گروه آلوده و درمان با میکروذرات کیتوزان به میزان ۰/۵ میلی گرم در هر نوبت، گروه آلوده و درمان با نانوذرات کیتوزان به میزان ۰/۵ میلی گرم در هر نوبت و گروه آلوده و درمان با نانوذرات کیتوزان به میزان ۱ میلی گرم در هر نوبت تقسیم شدند. به غیر از گروه ۱، بقیه گروه‌ها ۱۰^۴ عدد اووسیست کریپتوسپورییدیوم پارووم دریافت نمودند و گروه‌های درمان نیز دارو را به صورت گوارشی دریافت کردند. هر پنج گروه از نظر کاهش وزن، دفع اووسیست، سرولوژی و هیستوپاتولوژی روده بررسی شدند.یافته‌ها: در مقایسه وزن گروه‌های کنترل و درمان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. دفع اووسیست در گروه‌های درمان شده با کیتوزان و نانوکیتوزان کاهش چشمگیر داشته و با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار ($P < 0/05$) داشت. علی‌رغم بیشتر بودن کاهش دفع اووسیست در هنگام مصرف نانوکیتوزان نسبت به میکروذرات کیتوزان، تفاوت معنی‌داری در کاهش دفع اووسیست در مقایسه بین دو درمان مذکور مشاهده نشد. در تست ممانعت از هم‌آلودگی نیز گروه‌های درمان و کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. در بررسی هیستوپاتولوژیک روده تفاوتی بین گروه‌های مورد مطالعه دیده نشد. نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی تاثیر وابسته به دوز و دوره مصرف کیتوزان و نانوکیتوزان علیه آلودگی تجربی موش‌ها به کریپتوسپورییدیوم پارووم را نشان داد. لذا می‌توان جهت درمان کریپتوسپوریوزیس از آنها استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: کیتوزان، کریپتوسپورییدیوم پارووم، موش سوری، میکروذرات، نانوذرات.

نحوه استاندارد به این مقاله: شهبازی پ، نعمت الهی ا، حقی ع، شهبازفر ا ع، نفوذی ک. مقایسه اثر نانوذرات و میکروذرات کیتوزان بر آلودگی تجربی به کریپتوسپورییدیوم پارووم در موش سوری. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۷۲-۸۰

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم پارووم تک یاخته‌ای از شاخه آپی کمپلکسا است که ایتلیوم دستگاه گوارش را در طیف وسیعی از حیوانات و انسان آلوده می‌کند. تا چندی پیش این انگل به عنوان یک انگل فرصت طلب غیر متداول مطرح بود، ولی امروزه به عنوان یک انتروپاتوزن مشترک بین انسان و دام به‌ویژه در مبتلایان به نقص ایمنی مورد توجه قرار گرفته است (۱). این انگل دارای گسترش جهانی است. در افراد با سیستم ایمنی کامل، آلودگی به این انگل بدون علامت است یا اسهال‌های خود محدود شونده همراه با تهوع، استفراغ، سردرد، تب خفیف و کم‌آبی بدن بروز می‌کند. اما در اشخاصی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند به‌ویژه در مبتلایان به ایدز بیماری مذکور می‌تواند بسیار شدید باشد و باعث اسهال مزمن و مرگ بیمار گردد. مقاومت‌بودن اوو سیست این انگل در برابر عوامل محیطی، فیزیکی و شیمیایی، آن را از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت می‌نماید. بعد از ژیا ردیازیس، کریپتوسپوریدیوزیس مهم‌ترین عامل منجر به اسهال در جهان می‌باشد. تجربیات محققین حاکی از آن است که هیچ یک از ترکیبات ضد کوکسیدیایی یا آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف نمی‌توانند بر مراحل رشد انگل تاثیر کامل بگذارند (۲). بنابراین ناکارآمد بودن درمان‌های شیمیایی موجود و از طرفی اثر قوی سیستم ایمنی میزبان، موجب شده‌اند که کاربرد مواد و ترکیبات پیشگیری‌کننده برای مبارزه با این بیماری ضرورت یابد. از جمله این مواد کیتوزان و نانوکیتوزان هستند که دارای خاصیت تحریک رشد و تقویت سیستم ایمنی می‌باشند. کیتوزان یک پلیمر زیستی است که از داستیله کردن کیتین بدست می‌آید. کیتین که فراوان ترین پلی- ساکارید یافت شده در طبیعت است در دیواره خارجی حشرات، سخت‌پوستان و دیواره قارچ‌ها یافت می‌شود که نقش استحکام‌بخشی به دیواره سلول دارد. در واقع کیتوزان پلیمر ترکیبی گلوکز آمین و N استیل گلوکز آمین است که به‌وسیله پیوندهای ۱ و ۴ گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. به دلیل خواص منحصر به فرد کیتوزان، کاربرد آن در صنایع مختلف از جمله زیست فناوری پزشکی، دارویی، بهسازی فاضلاب، آرایشی و صنایع غذایی گزارش شده است. کیتوزان به‌عنوان یک ماده غیرسمی و تجزیه- پذیر شناخته می‌شود که میزان LD50 آن در موش بیش از ۱۶ g/kg است. ایمن بودن کیتوزان و خصوصیات مهمی چون توانایی حضور طولانی مدت در دستگاه گوارش به خاطر خاصیت چسبندگی به مخاط و همچنین توانایی افزایش نفوذپذیری سلولی باعث شده است که کیتوزان به صورت خوراکی در تحقیقات فراوانی استفاده شود (۳). نانوذرات کیتوزان از حل کردن کیتوزان در اسید استیک و به هم زدن شدید آن تحت اولتراسوند تولید می‌شود. نانوکیتوزان دارای خاصیت تحریک رشد و تقویت سیستم ایمنی می‌باشد. نانو ذرات کیتوزان همچنین برای مهندسی بافت، انتقال دارو، واکسینه کردن و انتقال DNA کاربرد دارد (۴). در بررسی که توسط Date و همکاران صورت گرفته مشخص گردید که استفاده از نانوذرات کیتوزان به‌عنوان همراه، جذب و شدت

تاثیر داروهای ضدانگلی شامل داروهای ضد مالاریا، ضد لیشمانیا و ضد تریپانوزوما را افزایش داده‌است (۵). نتایج بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان علیه تروفوزوئیت‌های تریکوموناس گالینه در محیط کشت توسط Tavassoli و همکاران مشخص نمود که میزان از بین رفتن تروفوزوئیت‌ها با غلظت‌های مختلف کیتوزان تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل داشته و نتیجه‌گیری شد که کیتوزان می‌تواند برای درمان تریکومونیا یزیس در کبوتر موثر باشد (۶). همچنین مطالعه Tafi و همکاران تاثیر کارآمد کیتوزان بر برخی پاسخهای ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و افزایش مقاومت آن در برابر آئروموناس را نشان داده است (۷). مطالعه حاضر جهت مقایسه اثرات میکروذرات و نانوذرات کیتوزان بر آلودگی تجربی ایجاد شده توسط کریپتوسپوریدیوم پارووم در موش سوری انجام پذیرفت.

روش کار

در این بررسی تعداد ۳۰ سر موش سوری ماده ۴-۶ هفته نژاد NMRI از انستیتو پاستور ایران تهیه و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز منتقل شدند. در روز صفر و قبل از گروه‌بندی موش‌ها، تمامی قفس‌ها و آب آشامیدنی آن‌ها ضدعفونی گردید؛ سپس موش‌ها توزین شده و در پنج گروه جداگانه تقسیم شدند. توزین موش‌ها روزانه تکرار گردید. برنامه روشنایی و خاموشی متناوب هر ۱۲ ساعت اعمال شد و از پلت‌های غذایی آماده جهت تغذیه آنها استفاده شد. در روز صفر و قبل از تجویز دگزانتازون، برای اطمینان از عدم آلودگی قبلی موش‌ها، از تمامی موش‌ها نمونه مدفوع جمع‌آوری و بررسی گردید. برای ایجاد سرکوب ایمنی در موش‌ها از روش Miller و همکاران استفاده شد. در این روش یک روز در میان دگزانتازون و تتراسیکلین در آب آشامیدنی موش‌ها مخلوط گردیده و در اختیار آن‌ها قرار گرفت و تا روز آخر مطالعه ادامه یافت (۸). موش‌های مورد مطالعه در ۵ گروه به شرح ذیل تقسیم شدند: گروه شاهد ۱: بدون سرکوب ایمنی، بدون آلودگی (عدم دریافت اوو سیست) و بدون درمان (این گروه جهت کنترل کلیه شرایط آزمایش در نظر گرفته شد)

گروه شاهد ۲: آلوده (دریافت اوو سیست)، بدون درمان (دریافت آب مقطر)

گروه تیمار ۱: آلوده (دریافت اوو سیست) و دریافت میکرو ذرات کیتوزان به میزان ۰/۵ میلی گرم در هر نوبت

گروه تیمار ۲: آلوده (دریافت اوو سیست) و دریافت نانوذرات کیتوزان به میزان ۰/۵ میلی گرم در هر نوبت

گروه تیمار ۳: آلوده (دریافت اوو سیست) و دریافت نانوذرات کیتوزان ۱ میلی گرم در هر نوبت

نانوکیتوزان از کیتوزان (سیگما، آمریکا) با جرم مولکولی متوسط (کد G50- 448877) در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز تهیه گردید. برای این منظور ابتدا کیتوزان در اسیداستیک با مولاریته مشخص

بودن توزیع داده‌ها نیز به روش کولموگروف اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

از نظر علائم ظاهری در موش‌های گروه شاهد ۲ و گروه درمان که دگزامتازون و اووسیسیت کریپتوسپوریديوم پارووم دریافت کرده بودند، کم‌حرکی، ژولیدگی موها و کاهش وزن مشهود بود. در آزمون آماری تفاوت معنی‌داری بین وزن گروه‌های درمان و شاهد وجود نداشت ($P > 0.05$). در نمونه‌های مدفوع تمامی موش‌ها مربوط به روز صفر قبل از تجویز دگزامتازون هیچ اووسیسیتی مشاهده نشد که نشانه عدم آلودگی قبلی موش‌ها به کریپتوسپوریديوم است. از روز ۴ پس از تلقیح اووسیسیت، دفع اووسیسیت در مدفوع موش‌های هر دو گروه شاهد و درمان آغاز شد که شمارش اووسیسیت تا روز نهم پس از تلقیح اووسیسیت ادامه یافت. جهت شمارش روزانه اووسیت‌ها در مدفوع از روش شناورسازی کلیتون‌لین و تعیین OPG (اووسیسیت در هر گرم مدفوع) استفاده شد. همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود میزان دفع اووسیسیت در گروه‌های درمان که به آنها کیتوزان و نانوکیتوزان تجویز شده بود رو به کاهش بود که کمترین میزان آن مربوط به روز ۷ پس از تلقیح اووسیسیت یعنی روز آخر دریافت درمان‌ها بود. در حالی که در گروه ۲ (شاهد) که کیتوزان و نانوکیتوزان را دریافت نکرده بودند، میزان دفع اووسیسیت روزانه در حال افزایش بود. تا پایان روز ۹ بین گروه ۲ (شاهد) و گروه‌های تیمار تفاوت معنی‌داری مشاهده شد که این نشانگر تاثیر نانوکیتوزان و کیتوزان معمولی در کاهش دفع اووسیسیت و مهار آلودگی به کریپتوسپوریديوم پارووم است. ولی تفاوت معنی‌داری در دفع اووسیسیت بین گروه‌های نانوکیتوزان و کیتوزان معمولی دیده نشد (جدول ۱). کاهش در میزان دفع اووسیسیت در هر سه گروه درمان نسبت به گروه شاهد ۲ بر اساس نتایج حاصل به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ به روش آنالیز واریانس یک طرفه دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). میزان کاهش دفع اووسیسیت در گروه درمان به صورت روزانه محاسبه شد که نتایج آن در نمودار ۲ قابل مشاهده است. بیشترین میزان کاهش در میزان دفع اووسیسیت مربوط به روز ۷ پس از تلقیح اووسیسیت و تجویز نانوکیتوزان (با دوز ۱ میلی‌گرم در هر نوبت) بود (۴۱/۷۹٪)، در گروه درمان با نانوکیتوزان (با دوز ۰/۵ میلی‌گرم در هر نوبت) این مقدار ۲۸/۵۷٪ و در گروه درمان شده با کیتوزان (۰/۵ میلی‌گرم در هر نوبت) ۲۵/۴۱٪ بود. لازم به ذکر است که در گروه کنترل ۶ تایی (گروه شاهد ۱) که هیچ یک دگزامتازون و اووسیسیت دریافت نکرده بودند، در تمام طول آزمایش (روز صفر تا روز آخر) دفع اووسیسیت در مدفوع مشاهده نگردید که نشان‌دهنده عاری بودن موش‌های مورد آزمایش از کریپتوسپوریديوم و صحت شرایط آزمایش است. این نتایج نشان‌دهنده تاثیر وابسته به دوز و وابسته به دوره مصرف درمان‌های به کار برده شده است. چون کاهش دفع اووسیسیت تا آخرین روز درمان (روز پانزدهم مطالعه) ادامه داشته

حل شده و در دستگاه اولتراسوند، شدیداً بهم زده شد. در این روش نانوکیتوزان با غلظت نهایی ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. جهت اطمینان از تهیه نانوکیتوزان از تکنیک‌های آنالیز حرارتی (TGA) و X-ray diffraction (XRD) استفاده گردید. نمونه‌های مدفوع از گوساله‌هایی که به صورت تجربی در موسسه تحقیقاتی امین‌آباد تهران آلوده شده بودند تهیه شد. جهت اطمینان از آلودگی، گسترش مدفوع تهیه شده و به روش ذیل نیلسون رنگ‌آمیزی شد. نمونه مدفوع تا زمان استفاده در محلول دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد ($K_2Cr_2O_7$) و در دمای یخچال نگهداری گردید. پس از دریافت ۴ دوز دگزامتازون، سرکوب ایمنی ایجاد شده و موش‌ها برای ایجاد آلودگی تجربی آماده شدند (۸). مطابق روش Jenkins و همکاران تجویز نانوذرات و میکروذرات کیتوزان با دوز مورد نظر در گروه‌های تیمار در روز هفتم مطالعه، از ۱۲ ساعت قبل از تلقیح اووسیسیت شروع شده و هر ۱۲ ساعت تکرار گردید. در گروه شاهد ۲ نیز به منظور برابر-سازی شرایط چالش به هر موش در هر نوبت ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر با گاوآژ تجویز شد (۹). بر اساس مطالعه Omidian و همکاران، دوازده ساعت پس از شروع خوراندن محلول‌های درمانی، اووسیسیت‌های کریپتوسپوریديوم به میزان 10^4 اووسیسیت مخلوط در ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات استریل به موش‌ها خوراندن شد (به جز گروه شاهد ۱) (۱۸). مدفوع هر موش روزانه جمع‌آوری گردیده و بررسی شد. دفع اووسیسیت از روز ۴ بعد از تلقیح اووسیسیت (روز دوازدهم مطالعه) به موش‌ها آغاز شد. جمع‌آوری مدفوع تا ۹ روز پس از تلقیح اووسیسیت (روز هفدهم مطالعه) ادامه یافت. جداسازی و شمارش اووسیسیت در مدفوع موش‌ها، مطابق با روش Kobayashi و همکاران انجام شد (۱۰). تست ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون جهت بررسی عملکرد ایمنی هومورال به منظور ارزیابی اثر تحریک ایمنی کیتوزان و نانوکیتوزان استفاده شد. در آخرین روز تزریق دارو، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از گلبول‌های قرمز مرغی به صورت داخل صفاقی به موش‌های گروه‌های مختلف تزریق شد. ۵ روز پس از تزریق خون مرغ، موش‌ها با رعایت موازین اخلاقی آسان‌کشی شده و نمونه خون و روده جهت انجام بررسی سرولوژی و پاتولوژی برداشته شد. جهت سنجش عیار آنتی‌بادی از تست ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون استفاده شد. ستون‌های مورد استفاده به‌ترتیب: ستون ۱ تا ۴ مربوط به گروه‌های درمان، ستون ۵-۸ مربوط به گروه شاهد و ستون ۹ گلبول‌های قرمز کنترل بود. ردیف‌های مورد استفاده به‌ترتیب: ردیف H: رقت ۱/۲، ردیف G: رقت ۱/۴، ردیف F: رقت ۱/۸، ردیف E: رقت ۱/۱۶، ردیف D: رقت ۱/۳۲ و ردیف C: رقت ۱/۶۴ بود. نمونه‌های بافت روده بعد از تهیه مقاطع میکروسکوپی با روش هماتوکسیلین-اوتوژین (H&E) و ذیل نیلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی شد و زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مقایسه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تی استفاده شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. همچنین نرمال

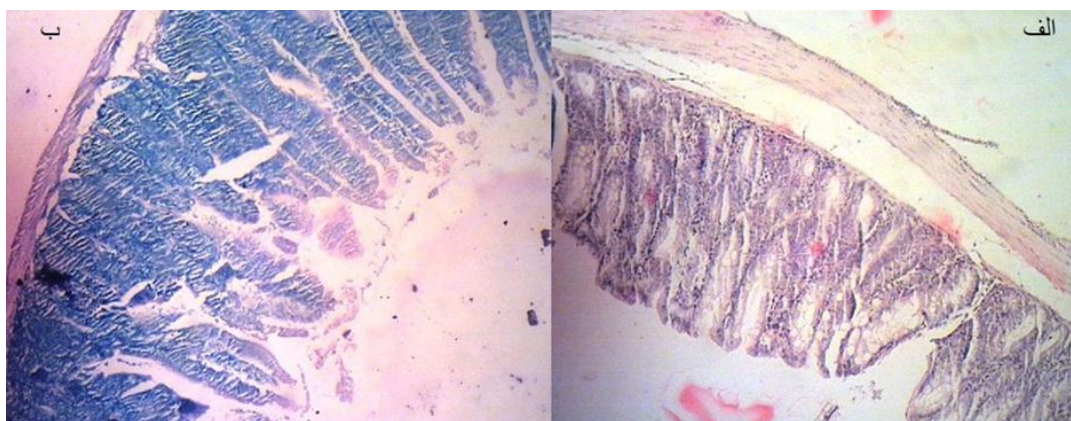
و پس از آن افزایش نسبی در میزان دفع اووسیت دیده شد (نمودار ۱). و نیز با افزایش دوز نانوکیتوزان کاهش دفع اووسیت مشاهده شد. در آزمایشگاه پس از تهیه مقاطع بافتی، لام‌ها به دو روش رنگ‌آمیزی H&E و ذیل نلسون اصلاح شده رنگ‌آمیزی شدند. در رنگ‌آمیزی ذیل نلسون و H&E روده موش‌ها هیچ‌گونه تغییرات هیستوپاتولوژیک در گسترش‌های روده در گروه درمان نسبت به گروه کنترل بدون دریافت دارو و کنترل بدون دریافت

اووسیت و دارو مشاهده نشد (تصویر ۱). در تست ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون، بنابر نتایج به دست‌آمده از آزمون آماری t -test عیار هم‌آگلوتیناسیون برای گروه‌های درمان 16 ± 0 و عیار هم‌آگلوتیناسیون برای گروه شاهد 10 ± 4 می‌باشد. و تفاوت معنی‌دار بین دو گروه درمان و شاهد وجود داشت ($P \leq 0/05$).

جدول ۱: میانگین دفع اووسیت در موش‌های گروه‌های درمان و شاهد

روز پس از تلقیح اووسیت گروه‌ها	۴	۵	۶	۷	۸	۹
گروه شاهد	$5/40 \pm 4/98$	$5/45 \pm 4/99$	$5/51 \pm 4/89$	$5/53 \pm 4/91$	$5/59 \pm 4/76$	$5/60 \pm 4/99$
گروه کیتوزان	$5/22 \pm 4/59$	$5/1 \pm 4/66$	$5 \pm 4/62$	$4/87 \pm 4/70$	$4/90 \pm 4/55$	$4/93 \pm 4/47$
گروه نانوکیتوزان (۰/۵ میلی گرم در هر نوبت)	$5/14 \pm 4/62$	$5 \pm 4/62$	$5 \pm 4/74$	$4/91 \pm 4/72$	$4/93 \pm 4/66$	$4/97 \pm 4/73$
گروه نانوکیتوزان (۱ میلی گرم در هر نوبت)	$5/22 \pm 4/47$	$5/02 \pm 4/68$	$4/79 \pm 4/58$	$4/60 \pm 4/55$	$4/73 \pm 4/77$	$4/81 \pm 4/66$

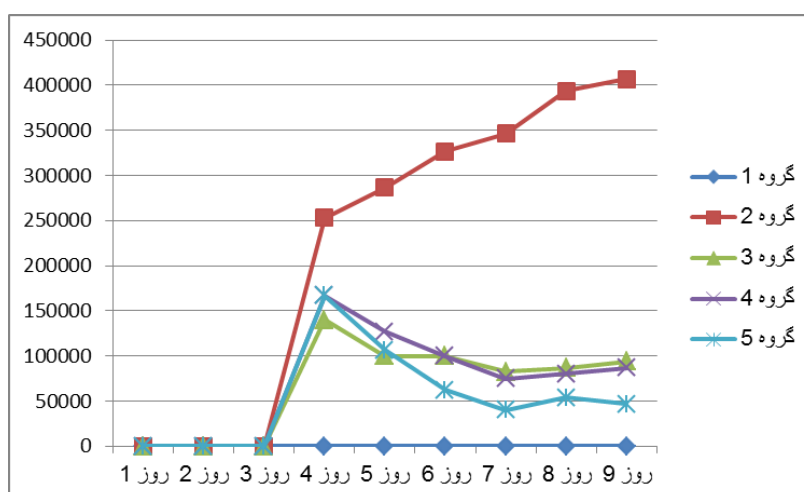
*تعداد اووسیت‌ها بر مبنای لگاریتم 10 می‌باشد



شکل ۱: تصاویر هیستوپاتولوژی روده موش‌های بررسی شده

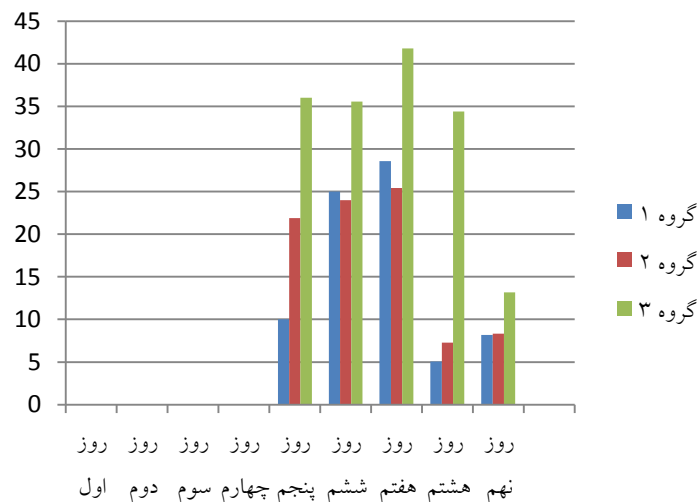
الف: مقطع روده با رنگ‌آمیزی H&E مربوط به یکی از موش‌های گروه شاهد ۱

ب: مقطع روده با رنگ‌آمیزی ذیل نلسون تغییر یافته مربوط به یکی از موش‌های گروه تیمار ۳



نمودار ۱: میانگین دفع اووسیت در دو گروه شاهد و آزمایش

گروه ۱: شاهد بدون آلودگی و بدون درمان، گروه ۲: شاهد آلوده بدون درمان، گروه ۳: گروه درمان با نانوکیتوزان (۰/۵ میلی گرم در هر نوبت)، گروه ۴: گروه درمان با کیتوزان (۰/۵ میلی گرم در هر نوبت)، گروه ۵: گروه درمان با نانوکیتوزان (۱ میلی گرم در هر نوبت).



نمودار ۲: درصد کاهش دفع اووسیست در گروه آزمایش

گروه ۱: گروه درمان با نانوکیتوزان (۰/۵ میلی گرم در هر نوبت)، گروه ۲: گروه درمان با کیتوزان (۰/۵ میلی گرم در هر نوبت) و گروه ۳: گروه درمان با نانوکیتوزان (۱ میلی گرم در هر نوبت)

بحث

(۱۷). در بررسی Omidian و همکاران ۱۰^۴ اووسیست کریپتوسپوریديوم پارووم به موش‌های ساپرس ایمنی تلقیح شد (۱۸). در بررسی حاضر نیز از دوز ۱۰^۴ اووسیست کریپتوسپوریديوم جهت آلوده کردن موش‌های سرکوب ایمنی شده استفاده شد. این مطالعه تاثیر کیتوزان و نانوکیتوزان را بر روی کریپتوسپوریديوم پارووم بررسی نموده است. نتایج این بررسی نشان‌دهنده تاثیر وابسته به دوز و وابسته به دوره مصرف کیتوزان و نانو کیتوزان بر آلودگی به کریپتوسپوریديوم پارووم در موش سوری است. که این نتیجه بر اساس شمارش اووسیست و مقایسه کاهش میزان دفع اووسیست در گروه‌های شاهد و تیمار بدست آمد. در بررسی مشابهی Said و همکاران تاثیر کیتوزان و نانوذرات کیتوزان را بر روی ژیرادیا مطالعه نمودند. ایشان نشان دادند که تعداد انگل در مدفوع موش‌های آلوده تحت درمان در مقایسه با گروه شاهد آلوده، کاهش یافته است (۱۹). Tavassoli و همکاران تاثیر کیتوزان را بر روی تروفوزوئیت تریکوموناس گالینه در شرایط آزمایشگاهی بررسی نمودند. آنها از غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده کردند. میزان از بین رفتن تروفوزوئیت‌ها در ساعات ۰، ۳ و ۶ پس از درمان با کلیه غلظت‌های کیتوزان به‌طور قابل توجهی با گروه کنترل متفاوت بود ($P \leq 0.05$). تروفوزوئیت‌ها بیشترین حساسیت (۱۰۰٪) را به بالاترین دوز کیتوزان در ساعت ۳ نشان دادند. در این زمان نتایج نابودی تروفوزوئیت‌ها با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب شامل ۹۳٪، ۹۵٪ و ۹۶٪ بوده است. نتایج به دست‌آمده نشان داد که استفاده از زیست مولکول کیتوزان یک گزینه امیدوارکننده برای درمان تریکومونیاژیس در کبوتر است (۶).

کیتوزان و نانوذرات آن دارای خاصیت ضد میکروبی و ضدانگلی است و تابحال از کیتوزان و نانوکیتوزان برای درمان بیماری‌های عفونی و تک یاخته‌ای از جمله تریکومونیاژیس و مالاریا و از سایر نانوذرات در درمان بیماری‌های انگلی از جمله توکسوپلاسموزیس و لیشمانیوزیس استفاده شده است (۱۴-۱۱، ۶). از آنجاکه نانوذرات بر روی تک‌یاخته‌ها مؤثر بوده‌اند و با توجه به اثر کیتوزان بر تک یاخته تریکوموناس و پلاسمودیوم، انتظار آن وجود دارد که کیتوزان و نانوکیتوزان بر روی کریپتوسپوریديوم نیز مؤثر باشد. کیتوزان به خاطر خاصیت چسبندگی به مخاط توانایی حضور طولانی مدت در دستگاه گوارش را داراست (۳)؛ بنابراین اثر آن در مقابله با تک یاخته گوارشی کریپتوسپوریديوم قابل توجه و بررسی است. تاکنون تاثیر میکروذرات و نانوذرات کیتوزان بر عفونت کریپتوسپوریديایی بررسی نشده است. موش یا رت‌های بالغ با ایمنی سرکوب‌شده به عنوان مطرح‌ترین مدل‌های آزمایشگاهی جوندگان برای تولید اووسیست‌های کریپتوسپوریديوم پارووم هستند و حساس‌ترین مدل موش شامل C57bl/6 و NMRI در آلودگی به کریپتوسپوریديوم می‌باشند (۱۵). در بررسی حاضر نیز از موش‌های ۴-۶ هفته نژاد NMRI استفاده گردید و تلقیح اووسیست پس از دریافت ۴ دوز دگزامتازون انجام شد. میزان تلقیح اووسیست مشابه بررسی‌های قبلی انجام شده در این زمینه بود. به‌طوری که در تحقیق Petry و همکاران به موش‌های ایمنوساپرس ۱۰^۶ اووسیست کریپتوسپوریديوم تلقیح شد (۱۶). در بررسی Brasseur به رت‌های ساپرس شده به وسیله هیدروکورتیزون استات، ۱۰^۵ اووسیست کریپتوسپوریديوم خورانده شد و این رت‌ها بعد از چند روز علائم بیماری را بروز دادند

هیستوپاتولوژیک بین گروه‌های تیمار و شاهد در بررسی حاضر می‌تواند فاصله زمانی قطع درمان تا کشتن موشها و بررسی هیستوپاتولوژیک باشد که جهت میسر شدن انجام تست HI این فاصله زمانی اجتناب‌ناپذیر بود. از طرفی چون اثر وابسته به دوز نانوکیتوزان در این مطالعه مشخص شد احتمال دارد با افزایش دوز و افزایش دوره مصرف نانوکیتوزان و کاهش فاصله قطع درمان تا مرگ بتوان در بررسی هیستوپاتولوژیک به نتیجه متفاوتی دست یافت. از نظر مشاهده علائم بالینی عنوان شده است که در کریتوسپوریدیوزیس پاسخ همه گونه‌ها به عفونت یکسان نیست. عفونت در جوندگان و خصوصاً موش‌ها بدون نشانه بالینی است و فقط به صورت دفع اووسیت نشان داده می‌شود و تخریب دستگاه گوارش در آنها بسیار نادر است (۲۳). در بررسی حاضر نیز علائم بالینی عفونت کریتوسپوریدیوز در هیچ یک از موش‌های گروه شاهد و درمان مشاهده نگردید و فقط دفع اووسیت وجود داشت. از نظر کاهش وزن نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های درمان و شاهد بدون دریافت دارو و شاهد بدون دریافت دارو و اووسیت وجود نداشت. در مطالعه‌ای که توسط Taylor در سال ۱۹۹۹ روی موش انجام گرفته، نشانه‌های بالینی در هیچکدام از حیوانات آلوده دیده نشد و از نظر وزنی هیچ تفاوتی با حیوانات غیرآلوده کنترل نداشته‌اند (۲۴). در بررسی Omidian و همکاران (۲۰۱۴) نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه درمان و شاهد از لحاظ کاهش وزن وجود نداشت (۱۸). در آزمایش ممانعت از هم‌آلودگی (HI)، تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین گروه‌های درمان و گروه کنترل دیده شد که نشانگر اثر کیتوزان و نانوکیتوزان در تحریک ایمنی هومورال است و از آنجا که در مهار عفونت کریتوسپوریدیوز تاثیر ایمنی هومورال محقق شده است (۲۵، ۲۶)، نتیجه این آزمایش نشان‌دهنده تاثیر درمان است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشانگر تاثیر نانوذرات و میکروذرات کیتوزان در کاهش دفع اووسیت و مهار آلودگی به کریتوسپوریدیوزیم پارووم در موش سوری است. البته علی‌رغم بیشتر بودن کاهش دفع اووسیت در مصرف نانوذرات کیتوزان، تفاوت معنی‌داری در دفع اووسیت بین گروه‌های نانوذرات و میکروذرات کیتوزان دیده نشد. احتمال دارد با افزایش دوز و افزایش دوره مصرف نانوذرات و میکروذرات کیتوزان تفاوت تاثیر این دو ماده در مقایسه مشهودتر و معنی‌دار شود که این خود نیز مبنای اثر وابسته به دوز و دوره مصرف این دو درمان است.

در بررسی دیگر Bahrami و همکاران تاثیر نانوکیتوزان را بر پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک مورد مطالعه قرار دادند. ایشان ضمن در نظر گرفتن نمونه کنترل، در سه تکرار، اثر دوزهای مختلف نانوکیتوزان بر روی پروتواسکولکس‌های جمع‌آوری شده در دو زمان نیم و یک ساعت با استفاده از رنگ اتوزین مورد بررسی قرار دادند. به‌طور متوسط درصد کشته‌شدن پروتواسکولکس‌ها در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد نانوکیتوزان در نیم و یک ساعت پس از انکوبه شدن به ترتیب ۱۷/۱۲، ۱۸/۴۲، ۲۲/۰۸، ۲۷/۲۱، ۲۹/۳۷ و یک ساعت پس از انکوبه کردن به ترتیب ۳۵/۳۱، ۳۸/۱، ۴۶/۲۱، ۴۸/۳۲، ۵۰/۰۱ بود. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که نانوکیتوزان دارای اثرات ضد پروتواسکولکی می‌باشد (۲۰). در آلودگی با کریتوسپوریدیوزیم، اسپوروزوئیت‌های تک‌یاخته به سلول‌های پوششی روده هجوم می‌برند و در راس مسواکی میکروویلی‌ها تشکیل واکوئل پارازیتوفوروس می‌دهند و با انجام مراحل تکثیر غیرجنسی و جنسی و هجوم به سلول‌های دیگر روده به این بخش آسیب می‌رسانند. معمولاً جراحات پاتولوژیک مشخص در روده کوچک دیده نمی‌شود، با این وجود در مقاطع بافتی آتروفی پرزهای روده کوچک، وجود تروفوزوئیت و اینفیلتراسیون لنفاتیک مشخص می‌باشد. در بررسی بر روی مقاطع بافتی تهیه شده و رنگ‌آمیزی شده به روش H&E و ذیل نیلسون اصلاح شده بافتی هیچ تفاوتی بین گروه‌های تیمار و گروه شاهد ۲ مشاهده نشد. در ضمن هیچ نوع ضایعه بافتی نیز در این مقاطع دیده نشد. در بررسی Nahrevanian و همکاران نیز هیچ‌گونه ضایعه‌ای در گسترش‌ها و مقاطع تهیه شده مشاهده نشد. نهروانیان دلیل احتمالی مشاهده نشدن کریتوسپوریدیوزیم را کوتاه بودن دوره آزمون معرفی کرد. چون برای دیده شدن انگل در بافت بایستی آلودگی به کریتوسپوریدیوزیم به صورت مزمن باشد و مزمن شدن بیماری احتیاج به دوره آزمون طولانی‌تری دارد (۱۵). در بررسی Kim و همکاران نیز از لحاظ تغییرات هیستوپاتولوژیک هیچ تفاوتی بین گروه‌های درمان و کنترل دیده نشد و نتایج تحقیق نشان داد که عصاره درخت کاج تاثیری بر روی کاهش آلودگی در بافت روده نداشته است (۲۱). در بررسی دیگری Al-Mathal دو روز پس از اتمام دوره درمان نمونه‌برداری انجام داده و یافته‌های هیستوپاتولوژیکی شامل وجود تفاوت بین گروه کنترل و درمان بوده است و بررسی هیستوپاتولوژیکی مقاطع ایلئوم در گروه درمان بهبود آسیب روده‌ای را نسبت به گروه شاهد نشان می‌داد. در گروه درمان ترمیم ویلی‌ها و ناحیه راس مسواکی، کاهش تروفوزوئیت کریتوسپوریدیوزیم و اینفیلتراسیون لنفاتیک نسبت به گروه شاهد دیده شد (۲۲). در بررسی Said و همکاران نیز یافته‌های هیستوپاتولوژیکی وجود تفاوت بین دو گروه درمان و شاهد را نشان داد و در گروه درمان نسبت به گروه شاهد بهبود زخم‌های روده‌ای مشاهده گردید (۱۹). علت عدم مشاهده تفاوت در بررسی

قدردانی

از سرکار خانم دکتر بهارک دیبوند به خاطر زحمت تهیه نانوکیتوزان و انجام آزمایش‌های مربوطه در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی ویژه داریم. حمایت مالی: این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تبریز و با استفاده از اعتبار اختصاص یافته به پایان‌نامه شماره ۲۲۶۴۰۴۰ انجام گرفته است.

منافع متقابل: نویسندگان مقاله هیچ‌گونه منافع متقابلی از تالیف و انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان: پ.ش و ا.ن و همکاران، طراحی اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را برعهده داشتند. همچنین نامبردگان مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند. ملاحظات اخلاقی: این مطالعه ملاحظات اخلاقی را شامل نمی‌شود.

References

- Carey C M, Lee H, Trevors J T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res* 2004; **38**(4): 818-862. doi: 10.1016/j.waters.2003.10.012
- Fayer R. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC press, New York, 1997; PP: 223-224.
- Bowman K, Leong K W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int J Nanomedicine* 2006; **1**(2): 117-128. doi: 10.2147/nano.2006.1.2.117
- Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S. Antimicrobial and Antifungal Effects of Acid and Water-Soluble Chitosan Extracted from Indian Shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) Shell. *J Fasa Univ Med Sci* 2013; **3**(1): 49-55. (In Persian)
- Date A, Joshi M, Patravale V. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliver Rew* 2007; **59**: 505-551. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.009
- Tavassoli M, Imani A, Tajik H, Moradi M, Pourseyed SH. Novel in vitro efficiency of chitosan biomolecule against *trichomonas gallinae*. *Iranian J Parasitol* 2011; **7**(1): 92-96.
- Tafi A, Meshkini S, Tokmechi A. Effects of Chitosan on some immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and enhance resistance against a pathogenic *Aeromonas hydrophila* following experimental infection. *J Anim Res* 2014; **26**(4): 468-477.
- Miller T A, Schaefer F W. Changes in mouse circulating leukocyte numbers in C57BL/6 mice immunosuppressed with dexamethasone for *cryptosporidium parvum* oocyst production. *Vet Parasitol* 2007; **149**: 147-166. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.08.017
- Jenkins M C, O'Brien C, Trout J, Guidry A, Fayer R. Hyperimmune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immunosuppressed adult mice. *Vaccine* 1999; **17**: 2453-2460. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00369-7
- Kobayashi C, Yokoyama H, Nguyen S A, Kodama Y, Kimata T, Izeki M. Effect of egg yolk antibody on experimental *cryptosporidium parvum* infection in Scid mice. *Vaccine* 2004; **23**: 232-235. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.05.034
- Boorboor Z, Alem aref M, Sadri M, Rasoli vani J, Aryafar M, Arab S, et al. The Prepared of Chitosan /Polyethylene Oxide /Henna Extract and Evaluate Its Anti-Bacterial Properties. *Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services* 2017; **39**(2): 14-18. Persian.
- Satyajit T, Sabyasachi D, Subhankari Prasad Ch, Sumanta Kumar S, Panchanan P, Somenath R. Synthesis, characterization of chitosan-tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and it's in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: A dose and duration dependent approach. *Int J Pharma* 2012; **434**: 292-305. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.05.064
- Anand N, Sehgal R, Kanwar R K, Dubey M L, Vasishta R K, Kanwar J R. Oral administration of encapsulated bovine lactoferrin protein nanocapsules against intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Nanomedicine* 2015; **10**: 6355-6369. doi: 10.2147/ijn.s85287
- Tripathi P, Dwivedi P, Khatik R, Jaiswal A K, Dube A, Shukla P, Mishra P R. Development of 4-sulfated N-acetyl galactosamine anchored chitosan nanoparticles: A dual strategy for effective management of Leishmaniasis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015; **136**: 150-159. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.037
- Nahrevanian H, Abedinzadeh L, Eslamifar A, Amini M, Naeimi S. Pathophysiology of cryptosporidiosis in immunosuppressed Balb/c and C57bl/6 mice Models. *Int J Infect Dis* 2011; **15**(1): 45-48. doi: 10.1016/S1201-9712(11)60198-7

16. Petry F, Robinson H A, McDonald V. Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect Immun* 1995; **60**(8): 3325-3331.
17. Brasseur P, Lemeteil d, Ballet J J. Curative and preventive anticryptosporidium activities of sinfungin in immunosuppressed adult rat model. *Antimicrob Agent Chem* 1993; **73**: 889-892. doi: 10.1128/aac.37.4.889
18. Omidian Z, Ebrahimzadeh E, Shahbazi P, Asghari Z, Shayan P. Application of recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 for isolation and prevention. *Parasitol Res* 2014; **113**: 229-237. doi: 10.1007/s00436-013-3648-0
19. Said D E, Elsamad L M, Gohar Y M. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. *Parasitol Res* 2012; **111**(2): 545-554. doi: 10.1007/s00436-012-2866-1
20. Bahrami S, Kharrati L, Asadi Z. *Survey on scolical effect of chitosan*. Proceeding of XXI national congress of sciences and food industrial, 2014, Available from: <http://civilica.com/Papers-Ncfoodi21> (Accessed May2014).
21. Kim C H, Healey J M. Effects of pine bark extract administered to immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Am J Chin Med* 2001; **29**(3-4): 469-475. doi: 10.1142/s0192415x01000484
22. Al-Mathal E M, Alsalem A M. Pomegranate (*Punica granatum*) peel is effective in a murine model of experimental *Cryptosporidium parvum*. *Exp Parasitol* 2012; **131**(3): 350-357. doi: 10.1016/j.exppara.2012.04.021
23. Current W L, Garcia L S. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; **4**(3): 325-358. doi: 10.1007/978-1-4612-3898-0_85
24. Taylor M A, Geach M R, Cooley W A. Clinical and pathological observations on natural infections of cryptosporidiosis and flagellate protozoa in leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Vet Rec* 1999; **145**(24): 695-699. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638796>
25. Angeles M, Morales G, Pozio E. Humoral and Cellular Immunity against *Cryptosporidium* Infection. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* 2002; **2**(3): 291-301. doi: 10.2174/1568005310202030291
26. McDonald V, Smith R, Robinson H, Bancroft G. Host Immune Responses against *Cryptosporidium*. *Contrib Microbiol* 2000; **6**(1): 75-91. doi: 10.1159/000060371

Original Article

Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Adenosine Deaminase Enzyme in Tuberculosis Meningitis

Parviz Saleh¹, Yousef Ahmadi^{2*}

Department of Infectious and Tropical Disease, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: dr_yousef.ahmadi@yahoo.com

Received: 27 December 2018 Accepted: 16 January 2019 First Published online: 20 May 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):81-88

Abstract

Background: Tuberculosis is still considered as one of the major health-care problems in our country and affects annually population of 10 to 20 million TB patients. The aim of this study was to evaluate the diagnostic value of cerebrospinal fluid adenosine deaminase enzyme in tuberculosis meningitis.

Methods: A total of 67 patients were included in the study based on CSF criteria that were suspected to cause saline meningitis. When performing LP, a 2-cc of CSF fluid was taken to measure the level of ADA fluid in the CSF. The level of ADA liquid CSF was measured using kinetic spectrophotometry.

Results: Highest ADA values in patients with TB meningitis (25.57 ± 19.63 IU/L) and the lowest ADA values in neuro-brucellosis meningitis (2.50 ± 0.57 IU/L). The amount of Cutoff Point was ADA in detecting TB meningitis with a sensitivity of 81.1% and specificity of 76.5%, equal to 9.68 IU.

Conclusion: ADA levels of cerebrospinal fluid in cases of TB meningitis, compared to non-TB meningitis, with a high sensitivity and specificity increase and is a simple and inexpensive diagnostic procedure, along with other diagnostic methods for the rapid diagnosis of TB meningitis.

Keyword: Adenosine Deaminase, Cerebrospinal Fluid, TB Meningitis, Bacterial Meningitis, Viral Meningitis

How to cite this article: Saleh P, Ahmadi Y. [Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Adenosine Deaminase Enzyme in Tuberculosis Meningitis]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):81-88. Persian.
--

مقاله پژوهشی

ارزش تشخیصی آنزیم آدنوزین دامیناز مایع مغزی نخاعی در مننژیت سلی

پرویز صالح^۱، یوسف احمدی^{۱*}

اگرچه بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسوول: ایمیل: dr_yousef.ahmadi@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۶ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۸۱-۸۸

چکیده

زمینه: توپرکلوزیس یا همان سل هنوز به عنوان یکی از معضلات مهم بهداشتی-درمانی در کشور ما محسوب می‌شود و سالانه به جمعیت بیماران مبتلا به سل ۱۰ تا ۲۰ میلیون نفر افزوده می‌شود. در این مطالعه سعی بر این بود تا ارزش تشخیصی آنزیم آدنوزین دامیناز مایع مغزی نخاعی در مننژیت سلی تعیین گردد.

روش کار: ۶۷ مورد از بیماران بر اساس معیارهای CSF که مشکوک به مننژیت سلی بودند وارد مطالعه شدند. هنگام انجام LP برای انجام بررسی مایع مغزی-نخاعی بیماران، ۲ سی‌سی از مایع CSF برای اندازه‌گیری سطح ADA مایع CSF اخذ شد. سطح ADA مایع CSF با استفاده از روش اسپکتروفتومتری کینتیک اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیشترین مقادیر اندازه‌گیری شده ADA در بیماران مبتلا به مننژیت توپرکلوز $14/63 \pm 20/57$ IU/L و کمترین مقادیر اندازه‌گیری شده ADA در مننژیت نوروبروسلوزیس $2/50 \pm 0/57$ IU/L مشاهده شد. مقدار ADA Cutoff Point در تشخیص مننژیت توپرکلوز با حساسیت ۸۱/۱ درصد و اختصاصیت ۷۶/۵ درصد برابر ۹/۶۵ IU بود.

نتیجه‌گیری: سطوح ADA مایع مغزی نخاعی در موارد مننژیت توپرکلوزی در مقایسه با مننژیت غیرتوپرکلوزی با حساسیت و اختصاصیت خوبی افزایش پیدا می‌کند و یک روش تشخیصی ساده و ارزان در کنار سایر روش‌ها برای تشخیص سریع مننژیت توپرکلوزی می‌باشد.

کلید واژه‌ها: آدنوزین دامیناز، مایع مغزی نخاعی، مننژیت سلی، مننژیت باکتریال، مننژیت ویرال

نحوه استناد به این مقاله: صالح پ، احمدی ی. ارزش تشخیصی آنزیم آدنوزین دامیناز مایع مغزی نخاعی در مننژیت سلی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۸۱-۸۸

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

توبرکلوزیس یا همان سل، هنوز به عنوان یکی از معضلات مهم بهداشتی-درمانی در کشور ما محسوب می‌شود. بر اساس برآورد سازمان بهداشت جهانی حدود ۲ میلیارد نفر در سراسر دنیا به میکروب توبرکلوزیس آلوده شده‌اند و سالانه به جمعیت بیماران مبتلا به سل ۱۰ تا ۲۰ میلیون نفر افزوده می‌شود. بسیار قابل توجه می‌باشد که ۹۵ درصد از این موارد در کشورهای در حال توسعه دیده می‌شود (۱). از این رو سل یکی از عوامل عمده مرگ و میر در کشورهای جهان سوم محسوب می‌گردد. سالانه حدود ۱/۳ میلیون کودک در سراسر دنیا به بیماری توبرکلوزیس مبتلا می‌شوند و نیز سالانه ۴۵۰ هزار کودک به دلیل بیماری سل فوت می‌کنند. شایع‌ترین تظاهر بیماری توبرکلوزیس، فرم ریوی آن می‌باشد. فرم خارج ریوی بیماری سل در کودکان شایع‌تر از بالغین بوده و یک سوم از موارد سل را در بر می‌گیرد. شایع‌ترین نواحی ابتلای خارج ریه به ترتیب شیوع، شامل غدد لنفاوی، پلور، دستگاه ادراری تناسلی، استخوان‌ها و مفاصل، مننژ و پریتون می‌باشد (۲). مننژیت سلی در کودکان شدیدترین عارضه سل قلمداد شده و بر اساس گزارشات مختلف از سراسر دنیا آمار آن متفاوت و مورتالیتت آن از ۰/۳ تا ۲۲ درصد گزارش شده است (۱). مننژیت سلی غالباً در نتیجه پاره شدن توبرکول ساب اپاندیمال به داخل فضای ساب آراکنوئید ایجاد می‌شود. گرفتاری مننژ اغلب در قاعده مغز بارزتر بوده و در موارد طول کشیده ایجاد توده ژلاتینی می‌کند که به پونز و اعصاب بینایی و کیاسمای اپتیک انتشار می‌یابد. در موارد مزمن نسوج فیروزه، اعصاب کرانیال را تحت فشار قرار می‌دهد. همچنین واسکولیت شراین و وریدهای لوکال منجر به آنوریسم، ترومبوز و انفارکتوس‌های هموراژیک فوکال می‌گردد (۳). علیرغم پیشرفت‌های مهمی که در زمینه تشخیص و درمان بیماری توبرکلوزیس و بخصوص مننژیت سلی صورت گرفته است هنوز این بیماری با میزان مرگ و میر و عوارض فراوانی همراه می‌باشد. تشخیص سریع بیماری از مورتالیتت بالای آن (۱۰ تا ۳۰ درصد) کاسته و مانع ایجاد عوارض عصبی ماندگار بیماری می‌گردد (۴). روش‌هایی که در حال حاضر جهت تشخیص بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد هر کدام دارای مزایا و معایبی می‌باشد. روش PCR و GLC (کروماتوگرافی مایع گاز) که از حساس‌ترین روش‌های تشخیصی می‌باشد، به علت گران قیمت بودن و تحقیقاتی بودن در دسترس عموم نمی‌باشند. اسمیر مستقیم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مایع مغزی نخاعی در کمتر از ۱۰ درصد موارد مثبت می‌شود (۶-۱۰) و کشت علی‌رغم حساسیت بسیار خوب آن، بعد از ۴ تا ۸ هفته قابل دستیابی می‌باشد (۶، ۷). آنزیم آدنوزین دامیناز (ADA) آنزیمی است که در مسیر سنتز مستقیم پورین دخالت می‌کند و آدنوزین ناشی از مصرف غیرقابل برگشت را به اینوزین و آمونیاک تبدیل می‌کند (۱۱). این آنزیم

برای فعالیت و تکثیر و تمایز لنفوسیت‌ها ضروری می‌باشد. غلظت سرمی ADA در بیماری‌هایی که پاسخ ایمنی سلول، پاسخ غالب بدن می‌باشد، افزایش می‌یابد (۸، ۹). افزایش این آنزیم به عنوان یک مایع تشخیصی در مایع پلور در پلورزی سلی بخوبی بررسی شده است. همچنین تعیین افزایش این آنزیم در مایع CSF و استفاده از آن به عنوان یک معیار تشخیصی سریع جهت مننژیت سلی مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اینکه مننژیت سلی یک بیماری مهم بوده و عدم تشخیص و درمان به موقع می‌تواند سبب ایجاد عواقب جدی در بیماران گردد و همچنین در دسترس بودن یک روش تشخیصی نسبتاً سریع می‌تواند در برخورد با این بیماران کمک شایانی کند، بنابراین با در نظر گرفتن اینکه بررسی سطح ADA در مایع مغزی نخاعی، یک روش نسبتاً سریع و در دسترس پیشنهادی برای ارزیابی مننژیت توبرکلوزی می‌باشد، و با توجه به اینکه در مطالعات صورت گرفته نتایج مشخصی در ارتباط با حساسیت و ویژگی این تست در Cut of point‌های گزارش شده، موجود نمی‌باشد (۱۲)، بنابراین بر آن شدیم تا مطالعه‌ای با هدف مقایسه سطح فعالیت آنزیم ADA-CSF در انواع مننژیت انجام دهیم.

روش کار

تمام بیماران مشکوک مبتلا به مننژیت سلی، مننژیت آسپتیک، مننژیت باکتریال، و نوروبروسلوزیس که در مرکز آموزشی درمانی امام رضا و سینا دانشگاه علوم پزشکی تبریز در طول سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۷ به مدت سه سال بستری شده‌اند، وارد مطالعه شدند و سطح آنزیم ADA در این بیماران برای تعیین نوع بیماری و روش‌های درمانی مورد نیاز چک شد. با توجه به تعداد بیماران بستری مشکوک مبتلا به مننژیت سلی، مننژیت آسپتیک، مننژیت باکتریال، و نوروبروسلوزیس به تعداد تقریبی ۷۰ مورد در سال، حجم نمونه اولیه مطالعه حاضر به تعداد تقریبی ۷۰ مورد در نظر گرفته شد. با توجه به ماهیت توصیفی تحلیلی مطالعه حاضر جمع‌آوری نمونه‌ها، به صورت تمام شماری و نمونه‌گیری در دسترس انجام گرفت. با در نظر گرفتن معیارهای ورود به مطالعه و خروج از آن، پس از شرح هدف از انجام مطالعه و نحوه اجرای آن به بیماران و یا خانواده آن‌ها، ۲۱۴ نفر از بیمارانی که مشکوک به مننژیت سلی، مننژیت آسپتیک، مننژیت باکتریال، و نوروبروسلوزیس می‌باشند و از فروردین سال ۱۳۹۴ لغایت مهر ۱۳۹۷ در بیمارستان امام رضا و سینا دانشگاه علوم پزشکی تبریز بستری می‌باشند، وارد مطالعه گردیدند. سپس بر اساس بررسی CSF تعداد ۶۷ بیمار مشکوک به مننژیت TB وارد مطالعه شدند و اطلاعات بیماران از پرونده بستری آن‌ها استخراج گردید. هنگام انجام LP برای بررسی مایع مغزی-نخاعی بیماران ۲ سی‌سی از مایع CSF برای اندازه‌گیری

۲ مورد مقادیر ADA پایین داشتند). در مطالعه حاضر میانگین $\pm$ انحراف معیار مقادیر آدنوزین دامیناز (ADA) به تفکیک انواع مننژیت در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین مقادیر اندازه گیری شده ADA در بیماران مبتلا به مننژیت توپرکلوز و کمترین مقادیر اندازه گیری شده ADA در مننژیت نوروبروسلوزیس مشاهده شد. تفاوت آماری معنی داری بین مقادیر ADA و گروه های مورد مطالعه مشاهده شد ($P=0/001$).

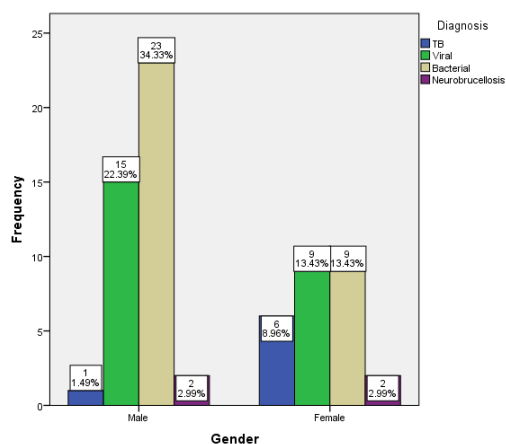
جدول ۱: میانگین $\pm$ انحراف معیار سن بیماران مورد مطالعه به تفکیک

دسته بندی	میانگین $\pm$ انحراف معیار (بیشترین) (سال)	P-value
مننژیت توپرکلوز	$44/57 \pm 14/04$ (۳۰-۶۸)	۰/۰۴۷
مننژیت باکتریال	$50/38 \pm 11/11$ (۳۴-۶۸)	
مننژیت ویرال	$48/82 \pm 11/74$ (۳۲-۶۷)	
سایر موارد مننژیت	$57 \pm 83/11$ (۳۱-۶۹)	

جدول ۲: میانگین $\pm$ انحراف معیار مقادیر آدنوزین دامیناز (ADA) به تفکیک انواع مننژیت

گروه	میانگین $\pm$ انحراف معیار	P-value
مننژیت توپرکلوز	$20/57 \pm 14/63$ IU	۰/۰۰۱
مننژیت باکتریال	$8/62 \pm 4/84$ IU	
مننژیت ویرال	$4/12 \pm 2/13$ IU	
مننژیت نوروبروسلوزیس	$2/50 \pm 0/57$ IU	

در جهت تعیین ارزش تشخیصی اندازه گیری مقادیر ADA در بیماران مبتلا به مننژیت توپرکلوز، از ROC Curve (نمودار ۱) به همراه تعیین حساسیت و اختصاصیت استفاده شد که نتایج به دست آمده در نمودار ۲ نشان داده شده است. مقدار مساحت زیر منحنی (AUC) برابر $0/858$ با $P=0/001$ بود. با توجه به اطلاعات به دست آمده مقدار Cutoff Point مقادیر ADA در تشخیص مننژیت توپرکلوز با حساسیت $81/1$ درصد و اختصاصیت $76/5$ درصد برابر $9/65$ IU بود.



نمودار ۱: فراوانی انواع مننژیت در بیماران مورد مطالعه به تفکیک جنسیت

سطح ADA مایع CSF اخذ شد. سطح ADA مایع CSF با استفاده از روش اسپکتروفتومتری کیتیک اندازه گیری شد. بیماران در طول مدت زمان بستری در بخش مراقبت های معمول بخش را دریافت کردند و هیچگونه مداخله تشخیصی و درمانی اضافی برای بیماران انجام نشد. پروسه تصادفی کردن بیماران با استفاده از نرم افزار آنلاین <http://www.graphpad.com> صورت گرفت. در مطالعه حاضر، انجام نمونه گیری برای اندازه گیری سطح ADA مایع مغزی نخاعی، همزمان با انجام LP معمول برای بررسی احتمال مننژیت مرسوم در بخش صورت گرفت، و بیمار متحمل انجام LP مجدد نشد. داده های حاصله با استفاده از نرم افزار تحلیل آماری SPSS version 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای هدف اختصاصی اول و هدف اختصاصی دوم داده ها به صورت آمار توصیفی $Mean \pm SD$ ، و حداقل، و حداکثر گزارش شدند. برای هدف اختصاصی سوم، توزیع نرمال داده های کمی با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov ارزیابی شد. برای مقایسه متغیرهای کیفی (جنسیت بیماران) از آزمون آماری Chi-Square (و در موارد لازم Fisher's exact Test) استفاده شد. و برای مقایسه متغیرهای کمی (سن بیماران، و سطح ADA در مایع CSF) در بین انواع مننژیت، آزمون Independent t Test یا Mann Whitney U Test مورد استفاده قرار گرفت و سطح معنی داری $P>0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه مقطعی، تعداد ۶۷ بیمار وارد مطالعه شدند. پس از تحلیل اطلاعات به دست آمده، بیماران مورد مطالعه بر حسب نوع مننژیت در ۴ دسته بندی کلی مننژیت توپرکلوز، باکتریال، ویرال و سایر موارد مننژیت مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین $\pm$ انحراف معیار سن بیماران مورد مطالعه به تفکیک در جدول ۱ نشان داده شده است. در بررسی حاضر از ۲۱۴ بیمار جمع آوری شده در طول مدت مطالعه، تعداد ۶۷ مورد با شک به مننژیت TB بر اساس CSF مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد ۶۰ مورد ($89/55$ درصد) Lymph Dominant و ۷ مورد ($10/45$ درصد) PMN Dominant با گلوکز CSF کاهش یافته بودند. از ۶۰ مورد بیمار با نتیجه Lymph Dominant، ۱۴ بیمار ($23/33$ درصد) که ADA بالا نیز داشتند، درمان TB دریافت کردند. برای ۷ مورد PMN Dominant با گلوکز کاهش یافته مجدداً LP و بررسی CSF انجام شد. با توجه به نتیجه به دست آمده، ۳ مورد ($42/85$ درصد) Lymph Dominant تغییر یافته بوده (که در بررسی انجام شده یک مورد مقادیر ADA بالا و دو مورد مقادیر ADA پایین داشتند که این دو مورد، مورد درگیری سل ریوی بوده و اسمیر مثبت TB داشتند) و ۴ مورد ($57/15$ درصد) PMN Dominant بودند و تشخیص مننژیت باکتریال داشتند (که ۲ مورد مقادیر ADA بالا و

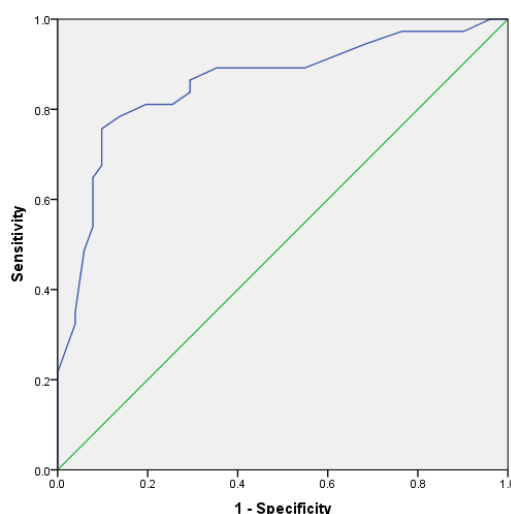
جمله این روش‌ها محسوب می‌شود. نقش سایتوکاین‌ها و آنزیم آدنوزین دامیناز در تشخیص انواع التهاب تایید شده است و غلظت آن در محل التهاب نسبت به سطوح سرمی شاخص بهتری از شدت بالینی بیماری محسوب می‌شود (۱۷، ۱۸). با توجه به میزان بالای مورتالیت و آسیب‌های ثانویه که به دنبال مننژیت توبرکلوز ایجاد می‌شود، به یک تست سریع و با حساسیت و دقت بالا برای تشخیص سریع این بیماری نیاز است (۱۹). تعدادی از مطالعات اخیر نشان داده‌اند که در تشخیص سریع، اندازه‌گیری ADA مایع مغزی نخاعی دقت بیشتری نسبت به PCR دارد (۲۰).

به علل مختلفی مقادیر تشخیصی ADA در مایع مغزی نخاعی در مطالعات مختلف اندازه‌گیری شده است و مقادیر به دست آمده به طور معنی داری در گروه بیماران مبتلا به مننژیت توبرکلوزی بیشتر از بیماران مبتلا به مننژیت ویرال و باکتریال به دست آمده است (۲۱، ۲۲).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ توسط Choi و همکاران انجام شد، با حساسیت ۸۳ درصد و اختصاصیت ۹۵ درصد مقدار Cut off ADA برابر ۷ IU/L برای تشخیص مننژیت توبرکلوزی به دست آمد (۲۳). در مطالعه Lopez و همکاران در سال ۱۹۹۵ نیز مقدار Cut off ADA بالای ۱۰ IU/L با حساسیت ۴۸ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد به دست آمد (۲۴).

در مطالعه حاضر تعداد ۶۷ بیمار مبتلا به مننژیت در چهار گروه مننژیت توبرکلوزی، باکتریال، ویرال و سایر موارد مننژیت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در مطالعه حاضر بیشترین مقادیر اندازه‌گیری شده ADA در بیماران مبتلا به مننژیت توبرکلوز (۲۰/۵۷±۱۴/۶۳ IU) و کمترین مقادیر اندازه‌گیری شده ADA در مننژیت نوروبروسلوزیس برابر (۲/۵۰±۰/۵۷ IU) مشاهده شد. همچنین مقدار ADA در مننژیت باکتریال برابر ۸/۶۲±۴/۸۴ و در مننژیت ویرال برابر ۲/۱۳±۴/۲ بود که تفاوت آماری معنی‌داری بین مقادیر ADA و گروه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (P=۰/۰۰۱). همچنین در بررسی حاضر مقدار Cutoff Point مقادیر ADA در تشخیص مننژیت توبرکلوز با حساسیت ۸۱/۱ درصد و اختصاصیت ۷۶/۵ درصد برابر ۹/۶۵ IU بود.

در مطالعه‌ای که توسط Chander و همکاران در سال ۲۰۱۳ در زمینه مقایسه مقادیر آنزیم آدنوزین دامیناز (ADA) در مننژیت توبرکلوز و غیرتوبرکلوز اندازه‌گیری شد و تعداد ۲۸ بیمار مبتلا به مننژیت سلی و ۲۲ بیمار مبتلا به مننژیت غیر سلی مورد مطالعه قرار گرفتند. با توجه به اطلاعات به دست آمده در این مطالعه، همسو با مطالعه ما مقدار ADA در بیماران مبتلا به مننژیت توبرکلوز برابر ۶/۲۴±۱۶/۴۶ IU/L و در بیماران مبتلا به مننژیت غیرتوبرکلوز برابر ۵/۱۳±۲/۹۶ IU/L بود؛ که به طور معنی‌داری میزان ADA در مننژیت توبرکلوز بیشتر بود (P=۰/۰۰۱). همچنین در این مطالعه همسو با مطالعه Cut off ADA بالاتر از



نمودار ۲: ROC Curve مربوط به ارزش تشخیصی اندازه‌گیری مقادیر ADA در بیماران مبتلا به مننژیت توبرکلوز

در بررسی حاضر در مقایسه مقادیر اندازه‌گیری شده ADA بین دو جنس تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد (P=۰/۰۵۷). با توجه به نتایج به دست آمده، مقدار اندازه‌گیری شده ADA در جنس مذکر برابر ۱۰/۶۶±۶/۶۶ IU و در جنس مونث برابر ۱۱/۵۷±۹/۰۵ IU بود.

بحث

مننژیت نوعی عفونت وخیم دستگاه عصبی مرکزی است که با عوارض شدید و پایدار و مرگ و میر بالا همراه می‌باشد. مننژیت بر اساس عوامل ایجاد کننده به دو نوع سپتیک با علت باکتریایی و آسپتیک با سایر علل تقسیم می‌شود. مننژیت باکتریایی از جمله بیماری‌های بسیار پر عارضه بوده و در ۵-۲ درصد موارد منجر به مرگ می‌شود. برای جلوگیری از ایجاد عوارض و کاهش مرگ و میر در مبتلایان به مننژیت باکتریایی، درمان آنتی‌بیوتیکی فوری و مناسب ضرورت دارد (۲، ۱۳، ۱۴). تشخیص به موقع مننژیت می‌تواند موارد پرخطر و نیازمند مراقبت‌های حمایتی خاص را از انواع مننژیت به نسبت کم عارضه تفکیک نماید و به محدود کردن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های غیرضروری و بستری شدن در بیمارستان کمک کند (۱۵). افتراق بین این دو نوع مننژیت به دلیل تشابه علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی و به ویژه تجویز آنتی‌بیوتیک در زمان پذیرش بیماران و قبل از کشت مایع مغزی نخاعی مشکل است (۱۶). کشت مایع مغزی نخاعی به عنوان روش قطعی تشخیصی در مبتلایان به مننژیت، مستلزم دسترسی به امکانات لازم و صرف زمان طولانی است (۲، ۱۴).

علاوه بر کشت عامل بیماری، امروزه روش‌های تشخیصی جدید تحت مطالعه قرار گرفته‌اند که اندازه‌گیری سطح برخی سایتوکاین‌ها (به عنوان واسطه برای پاسخ ایمنی) و آنزیم‌ها، از

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که سطوح ADA مایع مغزی نخاعی در موارد مننژیت توبرکلوزی در مقایسه با مننژیت غیرتوبرکلوزی با حساسیت و اختصاصیت خوبی افزایش پیدا می‌کند. این تست، یک روش تشخیصی ساده و ارزان در کنار سایر روش‌های تشخیصی برای تشخیص سریع مننژیت توبرکلوزی می‌باشد.

قدردانی

طرح حاضر نتیجه پایان نامه تخصصی رشته بیماری‌های عفونی و گرمسیری می‌باشد که با کد ۵۷۷۲۷ در سامانه پایان‌نامه‌های دانشگاه علوم پزشکی تبریز ثبت گردیده است. نویسندگان از حوزه معاونت پژوهشی و فناوری به دلیل فراهم کردن امکانات اجرای مطالعه تشکر و قدردانی می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با کد اخلاقی IR.TBZMED.REC.1397.029 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسیده است. فرایندهای بکار رفته منطبق با استانداردهای اخلاقی کمیته مسئول در رابطه با آزمایشهای انسانی (موسسه‌ای و ملی) و همچنین بیانیه هلسینکی در سال ۱۹۷۵ (بازبینی شده در سال ۲۰۰۸) بوده است. اگر شبهه‌ای در قبال اینکه آیا تحقیق انجام گرفته با بیانیه هلسینکی مطابقت دارد. بیماران، پس از شرح هدف از انجام مطالعه و نحوه انجام آن، و اخذ رضایت‌نامه کتبی آگاهانه از خود بیمار و یا بستگان درجه ۱ بیمار (در صورت عدم هوشیاری مناسب بیمار) وارد مطالعه شدند. همچنین در مطالعه حاضر هیچگونه هزینه اضافی از خانواده بیماران دریافت نشد و تمامی آزمایشات مربوط به روند درمانی روتین بیمارستانی می‌باشند. تمام اطلاعات به دست آمده در این مطالعه از پرونده بستری بیماران استخراج گردیده است و مداخله‌ای برای بیماران جهت این طرح انجام نشده است.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارند.

۱۰ IU/L با حساسیت ۸۲/۱۴ درصد و اختصاصیت ۹۰/۹۱ درصد در نظر گرفته شد (۱۰).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Moghtaderi و همکاران در زمینه مقایسه مقادیر ADA مایع مغزی نخاعی در مننژیت توبرکلوز و غیرتوبرکلوز انجام شد، تعداد ۴۲ بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. میانگین مقادیر ADA مایع مغزی نخاعی در بیماران مبتلا به مننژیت توبرکلوزی $(13/1 \pm 23/05)$ IU/L به طور معنی‌داری بیشتر از بیماران مبتلا به مننژیت غیرتوبرکلوزی $(5/18 \pm 9/39)$ IU/L بود ($P=0/001$). بالاترین دقت مشاهده شده در تشخیص مننژیت توبرکلوزی در مطالعه فوق در مقادیر ADA برابر $10/5$ IU/L مشاهده شد که حساسیت برابر ۸۱ درصد و اختصاصیت برابر ۸۶ درصد گزارش شد (۲۲).

در مطالعاتی که در خصوص افتراق مننژیت توبرکلوزی از غیرتوبرکلوزی انجام شده است، مننژیت غیرتوبرکلوز را شامل مننژیت‌های چرکی، آسپتیک و غیرعفونی تعریف کرده‌اند. همچنین برخی مطالعات مننژیت‌های غیرتوبرکلوزی را مربوط به مننژیت‌های کریپتوکوکال و نوروبرسلوزیس معرفی کرده‌اند. مقادیر مختلفی از Cut off ADA با حساسیت و اختصاصیت متفاوت گزارش شده‌اند. در مطالعه Chotmongkol و همکاران در سال ۲۰۰۶ مقادیر Cut off ADA برابر $15/5$ IU/L با حساسیت ۷۵ درصد و اختصاصیت ۹۳ درصد ($AUC=0/92$) برای افتراق مننژیت توبرکلوز و غیرتوبرکلوز گزارش شده است (۲۵). در مطالعه Kashyap و همکاران در سال ۲۰۰۶ با حساسیت ۸۲ درصد و اختصاصیت ۸۳ درصد Cut off ADA برابر $11/4$ IU/L بود (۲۶). در مطالعه Rana و همکاران در سال ۲۰۰۴ با حساسیت ۶۶/۶ درصد و اختصاصیت ۹۰ درصد مقدار Cut off ADA برابر 10 IU/L گزارش شد (۲۷).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Santa و همکاران در زمینه بررسی مارکر بیوشیمیایی ADA در تشخیص مننژیت توبرکلوز و رابطه آن با غلظت پروتئین CSF انجام شد، حساسیت $86/4$ درصد و اختصاصیت ۷۰ درصد با Cut off بالای $5/6$ IU/L گزارش شد. همچنین در این مطالعه حساسیت پروتئین CSF با Cut off بالای 100 mg/dL با حساسیت ۸۲/۸ درصد و اختصاصیت ۸۰/۷ درصد در تشخیص مننژیت توبرکلوز گزارش شد (۲۸).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Panjan و همکاران در زمینه بررسی ارزش تشخیصی ADA در سل خارج ریوی انجام شد، طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، مقادیر ADA بیماران مبتلا به مننژیت توبرکلوز بین $11/5-77/0$ IU/L میانگین $29/6$ IU/L بود. در این مطالعه حساسیت ۹۸ درصد و اختصاصیت ۹۵ درصد برای ADA در تشخیص مننژیت توبرکلوز گزارش شد (۲۹).

مشارکت مولفان

پ. ص و ی ا طراحی مطالعه و نظارت بر روند اجرایی مطالعه را بر عهده داشت. احمدی جمع‌آوری داده‌ها و آنالیز آماری

داده‌ها را بر عهده داشت، همچنین مقاله را تألیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تأیید کرده است.

References

- Curless R G, Mitchell C D. Central nervous system tuberculosis in children. *Pediatric neurology* 1991; 7(4): 270-274. doi: 10.1016/0887-8994(91)90044-L
- Kanoh Y, Ohara T, Akahoshi T. Acute inflammatory biomarkers in cerebrospinal fluid as indicators of blood cerebrospinal fluid barrier damage in Japanese subjects with infectious meningitis. *Clinical laboratory* 2011; 57(1-2): 37-46. doi: 10.1007/s10753-007-9054-y
- Victor M, Ropper A H. *Adams and Victor's principles of neurology*. McGraw-Hill, New York, 2001. doi: 10.1136/jnnp.73.2.211-b
- Heathcote E J, Shiffman M L, Cooksley W. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 2000; 343(23): 1673-1680. doi: 10.1056/NEJM200012073432302
- Hajiabdolbaghi M, Dezfuli A, Soudbakhsh A. Diagnostic evaluation of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid in tuberculous meningitis. *J Assoc Physician India* 1999; 47: 192-194. doi: 10.18535/jmscr/v4i9.43
- Klein N C, Damsker B, Hirschman S Z. Mycobacterial meningitis. Retrospective analysis from 1970 to 1983. *The American journal of medicine* 1985; 79(1): 29-34. doi: 10.1016/0002-9343(85)90542-X
- Prabu V, Agrawal S. Systemic lupus erythematosus and tuberculosis: a review of complex interactions of complicated diseases. *Journal of Postgraduate Medicine* 2010; 56(3): 24. doi: 10.4103/0022-3859.68653
- Ribera E, Martinez-Vazquez J M, Ocaña I. Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow-up of tuberculous meningitis in adults. *Journal of Infectious Diseases* 1987; 155(4): 603-607. doi: 10.1093/infdis/155.4.603
- Venkatesh J, Kaur A, Zachariah A. Molecular forms of adenosine deaminase do not aid the diagnosis of tuberculosis. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 1996; 90(6): 652-653. doi: 10.1016/S0035-9203(96)90421-6
- Chander A, Shrestha C D. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase levels as a diagnostic marker in tuberculous meningitis in adult Nepalese patients. *Asian Pacific journal of tropical disease* 2013; 3(1): 16-19. doi: 10.1016/S2222-1808(13)60004-3
- Piras M, Gakis C. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity in tuberculous meningitis. *Enzyme* 1972; 14: 311-317. doi: 10.1159/000459493
- Prasad R, Kumar A, Khanna B. Adenosine deaminase activity in cerebro-spinal fluid for diagnosis of tuberculous meningitis. *Ind J Tub* 1991; 38: 99-102. doi: 10.1097/00006454-198803000-00025
- Watson M A, Scott M G. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry* 1995; 41(3): 343-360. doi: 10.1373/clinchem.2007.099986
- Takahashi W, Nakada T-a, Abe R. Usefulness of interleukin 6 levels in the cerebrospinal fluid for the diagnosis of bacterial meningitis. *Journal of critical care* 2014; 29(4): 693. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.02.020
- Abdelmoez A T, Zaky D Z, Maher A M. Role of cerebrospinal fluid IL-8 as a marker for differentiation between acute bacterial and aseptic meningitis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 2014; 44(1): 205-210. doi: 10.12816/0006460
- Paula Ronzani Panato A, Trajano Tomasi L, Sasso Simon C. Meta-analysis identifies tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta as diagnostic biomarkers for bacterial and aseptic meningitis. *Current neurovascular research* 2014; 11(4): 340-348. doi: 10.2174/1567202611666140912120940
- Junior P, Laerte V L, Rebelo M. C. IL-6 and IL-8 in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis and bacterial meningitis: their potential role as a marker for differential diagnosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; 15(2): 156-158. doi: 10.1590/S1413-86702011000200011
- Ju E J, Ahn I C, Lee J H. The clinical significance of cerebrospinal fluid interleukin-6 levels in viral meningitis. *Korean Journal of Pediatrics* 2000; 43(4): 496-501. doi: 10.1093/tropej/46.6.378
- Mishra O, Loiwal V, Ali Z. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity and C-reactive protein in tuberculous and partially treated bacterial meningitis. *Indian pediatrics* 1995; 32(8): 886-889. doi: 10.1093/tropej/42.3.129
- Rana S, Chacko F, Lal V. To compare CSF adenosine deaminase levels and CSF-PCR for tuberculous meningitis. *Clinical neurology and neurosurgery* 2010; 112(5): 424-430. doi: 10.1016/j.clineuro.2010.02.012
- Tuon F F, Litvoc M N, Lopes M I. Adenosine deaminase and tuberculous pericarditis—a systematic review with meta-analysis. *Acta tropica* 2006; 99(1): 67-74. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.07.004
- Moghtaderi A, Niazi A, Alavi-Naini R. Comparative analysis of cerebrospinal fluid adenosine deaminase in

- tuberculous and non-tuberculous meningitis. *Clinical neurology and neurosurgery* 2010; **112**(6): 459-462. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.12.006
23. Choi S.-H, Kim Y S, Bae I-G. The possible role of cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity in the diagnosis of tuberculous meningitis in adults. *Clinical neurology and neurosurgery* 2002; **104**(1): 10-15. doi: 10.1016/S0303-8467(01)00159-7
24. Lopez-Cortes L, Cruz-Ruiz M, Gomez-Mateos J. Adenosine deaminase activity in the CSF of patients with aseptic meningitis: utility in the diagnosis of tuberculous meningitis or neurobrucellosis. *Clinical infectious diseases* 1995; **20**(3): 525-530. doi: 10.1093/clinids/20.3.525
25. Chotmongkol V, Teerajetgul Y, Yodwut C. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity for the diagnosis of tuberculous meningitis in adults. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* 2006; **948**(5): 37. doi: 10.1093/tropej/42.3.129
26. Kashyap R S, Kainthla R P, Mudaliar A V. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity: a complimentary tool in the early diagnosis of tuberculous meningitis. *Cerebrospinal fluid research* 2006; **3**(1): 5. doi: 10.1186/1743-8454-3-5
27. Rana S V, Singhal R K, Singh K. Adenosine deaminase levels in cerebrospinal fluid as a diagnostic test for tuberculous meningitis in children. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2004; **19**(2): 5. doi: 10.1007/BF02894249
28. Sen G, Banerjee S, Hazra A. CSF-Adenosine Deaminase Activity As A Biochemical Marker Of Tb Meningitis Diagnosis And Its Correlation With CSF-Protein Concentration-A Cross-Sectional Study In A Super-Speciality Hospital. *International Journal of Scientific Research* 2018; **7**(4): 15-18. doi: 10.7860/JCDR/2017/25823.9625
29. Ranjan P K, Vikram K, Prasad N. Diagnostic Value of Adenosine Deaminase (Ada) Activity in Extra Pulmonary Tuberculosis. *International Journal of Scientific Research* 2018; **7**(1): 13-19. doi: 10.21276/ijlssr.2017.3.3.17

Original Article

Changes in Serum Levels of Interleukin-8 in Upper and Lower Urinary Tract Infections in 3 months to 12 years' children in Semnan

Mojgan Mazaheri* 

Department of Nephrology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

*Corresponding author; E-mail: mojganmazaheri@gmail.com

Received: 3 December 2017 Accepted: 6 February 2018 First Published online: 20 May 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):89-96

Abstract

Background: Urinary tract infection (UTI) is one of the most common bacterial diseases in children. This infection can lead to serious complications, such as chronic kidney injury, chronic renal failure, and even hypertension. The aim of this study was to investigate changes in serum levels of interleukin-8 in upper and lower urinary tract infections, and to investigate its association with the type of urinary tract involvement.

Methods: This was a cross-sectional and prospective study. The study population consisted of all children aged 3 months to 12 years' old who referred to Amiralmomenin Hospital in Semnan city. By convenience sampling, 57 children were enrolled and received either oral or injectable treatment. Interleukin-8 serum levels were measured before and 3 days after treatment, by ELISA method and using available kits. DMSA scan was performed one week after admission to assess the severity of kidney parenchymal involvement in order to determine and distinguish between lower and upper urinary tract infections.

Results: Totally 57 subjects with mean age 21.2 ± 20.76 months were enrolled. Children aged more than 20 months were more likely to have upper urinary tract infection than the other group ($P=0.005$). In males, the prevalence of upper urinary tract infection was significantly lower ($P = 0.049$). Children with upper urinary tract infection had a higher interleukin-8 concentration ($P=0.001$) than the lower urinary tract infection.

Conclusion: IL-8 had higher serum concentrations in upper urinary tract infections compared to lower urinary tract infections. As a result, this test can be used as a suitable substitute for DMSA scan, to predict the type of urinary tract infection.

Keyword: Interleukin 8, Infections, Urinary tract, Renal failure.

How to cite this article: Mazaheri M. [Changes in Serum Levels of Interleukin-8 in Upper and Lower Urinary Tract Infections in 3 months to 12 years' children in Semnan]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):89-96. Persian.

مقاله پژوهشی

تغییرات مقادیر سرمی اینترلوکین ۸ در عفونتهای دستگاه ادراری فوقانی و تحتانی کودکان ۳ ماه تا ۱۲ ساله در سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ در سمنان

مژگان مظاهری 

فوق تخصص نفرولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
* نویسنده مسؤل: ایمیل: mojganmazaheri@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۸۹-۹۶

چکیده

زمینه: عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین بیماری‌های باکتریال در کودکان محسوب می‌شود. این عفونت می‌تواند عوارض جدی، مانند آسیب دائم کلیوی، نارسایی مزمن کلیه و حتی پرفشاری خون به دنبال داشته باشد؛ هدف این مطالعه، بررسی تغییرات سطح سرمی اینترلوکین ۸ در عفونت‌های ادراری فوقانی و تحتانی و نیز، بررسی ارتباط آن با نوع درگیری سیستم ادراری بود.

روش کار: مطالعه‌ی حاضر یک مطالعه‌ی مقطعی آینده نگر است. جامعه‌ی آماری شامل تمامی کودکان ۳ ماه تا ۱۲ ساله‌ی مراجعه کننده به بیمارستان امیرالمومنین(ع) شهرستان سمنان بود که با روش نمونه‌گیری آسان در دسترس، تعداد ۵۷ کودک انتخاب شدند و بر حسب نیاز و براساس تشخیص پزشک، به صورت خوراکی یا تزریقی با یک پروتکل واحد درمان شدند. سطح سرمی اینترلوکین ۸، قبل از درمان و ۳ روز بعد از شروع درمان، با روش الایزا و با استفاده از کیت‌های در دسترس، اندازه‌گیری شد. اسکن DMSA نیز، یک هفته پس از بستری برای بررسی شدت درگیری پارانشیم کلیه، جهت تعیین و افتراق عفونت‌های ادراری تحتانی و فوقانی انجام گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۵۷ نفر با میانگین سنی $21/2 \pm 20/76$ ماه، وارد مطالعه شدند. کودکان با سن بیش از ۲۰ ماه نسبت به گروه دیگر، بیش‌تر به عفونت سیستم ادراری فوقانی مبتلا شده بودند ($P=0/005$). در افراد مذکر، شیوع عفونت ادراری فوقانی، به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود ($P=0/049$). کودکان مبتلا به عفونت دستگاه ادراری فوقانی نسبت به تحتانی، غلظت اینترلوکین ۸ ($P=0/001$) بالاتری داشتند.

نتیجه‌گیری: در کل، نتایج این مطالعه نشان داد که اینترلوکین ۸ از غلظت سرمی بالاتری در عفونت‌های ادراری فوقانی نسبت به عفونت‌های ادراری تحتانی برخوردار بود، در نتیجه از این آزمایش می‌توان به‌عنوان جایگزین مناسبی برای اسکن DMSA در پیش‌گویی نوع عفونت سیستم ادراری استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: اینترلوکین ۸، عفونتهای دستگاه ادراری، نارسایی کلیه

نحوه استناد به این مقاله: مظاهری م. تغییرات مقادیر سرمی اینترلوکین ۸ در عفونتهای دستگاه ادراری فوقانی و تحتانی کودکان ۳ ماه تا ۱۲ ساله در سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ در سمنان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۸۹-۹۶

حق تألیف برای مؤلف محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری (Urinary Tract Infection=UTI)، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های باکتریال در کودکان محسوب می‌شود. این بیماری در ۵ درصد شیرخواران (۳-۵ درصد دختران و یک درصد پسران) رخ می‌دهد (۲۱) و از علل اصلی آسیب پایدار اکتسابی کلیه (اسکار کلیه) محسوب می‌شود که خود، عوارضی جدی هم‌چون هیپرتانسیون یا نارسایی مزمن کلیه را در پی دارد (۱)؛ لذا، تشخیص صحیح و بموقع، درمان و پی‌گیری مناسب آن از اهمیت خاصی برخوردار است.

عفونت دستگاه ادراری شایع‌ترین عفونت باکتریایی است که مستقل از سن است. همچنین یکی از شایع‌ترین علل بستری شدن برای عفونت و شایع‌ترین نشانه برای نسخه‌های آنتی بیوتیک در مراقبت‌های اولیه است. تشخیص و مدیریت عفونت‌های دستگاه ادراری تحتانی و فوقانی به علت شایع بودن و عود آنها و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در سراسر جهان موضوع پر اهمیتی است. UTI اغلب علائم بالینی نامشخص دارد یا اینکه کلاً بدون علامت است. تشخیص دقیق و درمان اولیه به دلیل خطر سستی سمی و عواقب طولانی مدت بسیار مهم است (۳). در عفونت ادراری، درگیری پارانشیم کلیه در فاز حاد (پیلونفریت حاد) را تنها با اسکن DMSA (دی مرکاپتوسوسکسینیک اسید) می‌توان بطور قطع تعیین نمود که روشی بسیار حساس برای تشخیص پیلونفریت حاد و حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش تشخیصی برای تشخیص آسیب کلیه (اسکن تاخیری ۴ تا ۶ ماه بعد از عفونت و یا دیرتر) است (۱ و ۳ و ۴) اما متأسفانه، این روش‌ها در همه‌جا در دسترس نیستند و بسیاری‌ها هستند و از طرفی، عوارضی همانند رادیاسیون را در بر دارند. در نتیجه، علی‌رغم حساسیت و ویژگی بالای این تست‌ها، تحقیقات برای پیدا کردن تست‌های ساده‌تر، ارزان‌تر و در دسترس‌تر ادامه دارد. یکی از این روش‌های کم‌تر تهاجمی، اندازه‌گیری سایتوکین‌های التهابی است (۵). پاسخ مخاطی در برابر تهاجم باکتری به سیستم ادراری، شامل تولید سایتوکین‌ها توسط لکوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های اپی-تلیال است (۶-۸). در این بین، تولید اینترلوکین، قسمتی از پاسخ موضعی و سیستمیک به تهاجم باکتری‌های گرم منفی دخیل در UTI است که با واسطه‌ی لپوپولی‌ساکارید باکتری و خود میکروارگانیسم صورت می‌گیرد (۹ و ۱۰). از این رو، دور از انتظار نیست که این سایتوکین، موجب بروز تخریب بافت کلیه و حتی ایجاد اسکار دائمی در آن شود؛ به‌طوری که حتی با درمان کامل UTI با آنتی‌بیوتیک نیز اسکار کلیه بروز می‌کند (۱۱ و ۱۲) و چون پاسخ التهابی ناشی از وجود میکروارگانیسم، منجر به مهاجرت شدید سلول‌های التهابی از جمله لکوسیت‌ها و ماکروفاژها به کانون عفونت می‌شود. این سلول‌های التهابی در حین انجام فاگوسیتوز، از خود سایتوکین‌های مختلف به‌ویژه اینترلوکین (IL۸)، رادیکال‌های

آزاد اکسیژن و آنزیم‌های لیزوزومال آزاد می‌سازند که می‌توانند آثار به‌مراتب مخرب‌تری نسبت به خود میکروارگانیسم بر سلول‌های میزبان داشته باشند و سبب تخریب بافتی و در نتیجه، ایجاد اسکار کلیه شوند (۱۳-۱۵). گذشته از این، سایتوکین‌های مختلف به‌ویژه IL۸، منجر به آسبه و نکروز در ساختمان کلیه می‌شوند و با از بین رفتن آسبه‌های نکروتیک و جایگزینی ارتشاح نوتروفیلی به جای ارتشاح سلول‌های مونونوکلئوئر، پرولیفراسیون عروقی و فیبروز جای‌گزین می‌شود و در مدت نسبتاً کوتاهی، منجر به گسترش بافت اسکار در کلیه می‌گردد (۱۶ و ۱۷).

مطالعه‌ای در تایوان نشان داد که سطح سرمی و ادراری اینترلوکین ۸ در کودکان مبتلا به پیلونفریت، نسبت به کودکان مبتلا به عفونت سیستم ادراری تحتانی به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. در این مطالعه سطح بالای اینترلوکین ۸ و سن کم‌تر از ۲۰ ماه و گریدهای بالای ریفلاکس، از عوامل خطر برای اسکار کلیه بودند. همچنین، در کودکان با سن کم‌تر از ۲ سال که در فاز حاد پیلونفریت یا درجات بالای ریفلاکس کلیوی بودند و سطح بالای اینترلوکین ۸ را داشتند، احتمال ایجاد اسکار کلیه در آینده بیش‌تر بود. میانگین سن کودکان با اسکار کلیه، کم‌تر از میانگین سنی کودکان بدون اسکار بود (۱۸). مطالعه‌ای دیگر در یونان روی ۵۰ کودک که در ۴ گروه تقسیم شدند (با اسکار و ریفلاکس- بدون اسکار بدون ریفلاکس- بدون اسکار با ریفلاکس- بدون اسکار و ریفلاکس) نشان داد که سطح ادراری اینترلوکین ۸ در تمامی نمونه‌ها، کم‌تر از پایین‌ترین حد نرمال بود. ارتباط معنی‌داری بین شدت اسکار کلیه و زمانی که از آخرین عفونت ادراری گذشته بود، وجود داشت (۱۹). مطالعه‌ای دیگر در ایران بر روی ۸۴ کودک در ۳ گروه با سابقه‌ی اسکار (پیلونفریت) و ریفلاکس- با سابقه‌ی اسکار (پیلونفریت) و بدون ریفلاکس- بدون سابقه‌ی اسکار (پیلونفریت) و ریفلاکس انجام شد. سطح اینترلوکین ۸ در کودکانی که در گروه یک بررسی قرار داشتند، بالاتر از سایر گروه‌ها بود. بنابراین، اندازه‌گیری این سایتوکین می‌تواند به تعیین درجه‌ی بالای ریفلاکس، کمک‌کند (۲۰). با توجه به مطالب ذکر شده و همچنین با توجه به فقدان مطالعات کافی در رابطه با ترشح سایتوکین سرمی در زمان عفونت، هدف از این مطالعه، تعیین ارزش سطح اینترلوکین ۸ در کودکان مبتلا به عفونت ادراری، جهت تشخیص و افتراق عفونت‌های ادراری تحتانی از فوقانی بود.

روش کار

این مطالعه، یک مطالعه‌ی مقطعی بود که روی کودکان مراجعه-کننده به بیمارستان امیرالمومنین (ع) سمنان انجام شد. جامعه‌ی آماری این مطالعه، تمامی کودکان مراجعه‌کننده به بیمارستان امیرالمومنین (ع) سمنان بودند؛ زمان انجام مطالعه، از آبان‌ماه ۱۳۹۳

t، مجذور کای در شرایط نرمالیتی t استفاده شد. برای آنالیز نرمالیتی داده ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. از شاخصهای مرکزی مثل میانگین و شاخصهای پراکندگی مثل انحراف معیار برای اهداف توصیفی استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه، ۵۷ نفر کودک مراجعه کننده به بیمارستان امیرالمومنین (ع) سمنان، که مبتلا به عفونت دستگاه ادراری بودند، وارد مطالعه شدند. میانگین و انحراف معیار سن افراد، به ترتیب ۲۱/۲ و ۲۰/۷۶ ماه بود. کمترین سن ۴ ماه و بیشترین سن ۱۲۰ ماه بود. بیشترین افراد شرکت کننده در این مطالعه، سن ۲۰ ماه یا کم تر داشتند (۶۳/۲٪). از ۵۷ نفر کودک مورد بررسی، ۳۱ نفر (۵۴/۴٪) مونث و ۲۶ نفر (۴۵/۶٪) مذکر بودند. از ۵۷ نفر کودک مورد بررسی، بر مبنای اسکن DMSA و معاینات کلینیکی و بررسی های پاراکلینیکی، ۳۳ نفر (۵۷/۹٪)، مبتلا به عفونت ادراری تحتانی (سیستیت: اسکن طبیعی) و ۲۴ نفر (۴۲/۱٪)، مبتلا به عفونت ادراری فوقانی (پیلونفریت: اسکن غیرطبیعی) بودند. میانگین و انحراف معیار سن کودکان مبتلا به عفونت سیستم ادراری فوقانی، به ترتیب ۲۶/۷ و ۴/۱۹ ماه بود. همچنین، میانگین و انحراف معیار سن کودکان مبتلا به عفونت سیستم ادراری تحتانی، به ترتیب ۱۳/۹ و ۱/۴۶ ماه بود. بین گروه های سنی کودکان با نوع عفونت ادراری، رابطه ای معنی داری مشاهده شد ($P=0/005$)؛ به این معنی که کودکان با سن بیش تر از ۲۰ ماه نسبت به کودکان با سن ۲۰ ماه و کم تر، بیش تر به عفونت سیستم ادراری فوقانی مبتلا شده بودند. بین جنسیت کودکان با نوع عفونت ادراری، رابطه ای معنی داری مشاهده شد: در افراد مذکر، شیوع عفونت ادراری فوقانی نسبت به عفونت ادراری تحتانی، به طور معنی داری کم تر بود (۳۰/۷٪ در مقابل ۶۹/۲٪ و $P=0/049$)؛ اما این رابطه در افراد مونث، تفاوت معنی داری نداشت ($P=0/875$).

با استفاده از منحنی ROC سطح زیر منحنی در مورد ایترولوکین ۸ در تشخیص عفونت ادراری ۰/۶۷۳ بود. همچنین سطح زیر منحنی ROC در مورد ایترولوکین ۸ در پیشگویی نتیجه ای اسکن DMSA ۰/۶۳۰ بود.

نتایج آزمون آماری t زوجی و برقراری نرمالیتی به کمک آزمون ناپارامتریک کلموگروف اسمیرنوف نشان داد که بین غلظت ایترولوکین ۸ در زمان های صفر (شروع درمان) و ۳ روز بعد از درمان با آنتی بیوتیک، رابطه ای معنی داری وجود داشته است (جدول ۱)؛ براساس جدول ۱، درمان با آنتی بیوتیک، با رابطه ای معنی داری باعث کاهش غلظت ایترولوکین ۸ شده است؛ به طوری که غلظت ایترولوکین ۸، بعد از مداخله نسبت به قبل از مداخله ($116/53 \pm 1/15$) در مقابل $275/07 \pm 2/07$ و $P<0/001$) با رابطه ای معنی داری کاهش یافت.

تا آبان ماه ۱۳۹۴ بود. نمونه گیری هر دو گروه با استفاده از روش آسان (در دسترس) و از میان مراجعین سرپایی صورت گرفت. با توجه به تحقیقات قبلی (۹۵) حداقل حجم نمونه برای هر گروه، حداقل ۲۶ نفر و در دو گروه تحتانی و فوقانی حداقل ۵۲ نفر، برآورد گردید. این پژوهش، پس از کسب اجازه از کمیته ای اخلاق و معاونت پژوهشی دانشگاه آغاز شد. رضایت آگاهانه از والدین برای شرکت در مطالعه اخذ شد. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از: کودکانی که ۳ ماه تا ۱۲ سال سن داشتند و برای اولین بار مبتلا به عفونت ادراری شده بودند، و رضایت والدین برای شرکت در مطالعه. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: وجود سابقه ای بیماری های مزمن کلیوی، مثل سنگ کلیه، نارسایی کلیه، بیماری کیستیک کلیه، سابقه ای درمان با کورتیکواستروئید و عفونت ادراری راجعه. از بیماران مشکوک، براساس معاینات بالینی توسط پزشک متخصص کودکان نمونه ای ادراری جهت کشت و آنالیز گرفته شد. بر اساس کشت مثبت ادراری (معادل رشد ۱۰۰۰۰۰ برای یک ارگانیزم)، همراه با پیوری و سایر علائم (بوی بد ادرار، بی قراری و تب)، تشخیص عفونت ادراری گذاشته شد. تمامی بیماران در هفته ای اول، تحت سونوگرافی سیستم ادراری جهت بررسی هر گونه آنومالی قرار گرفتند. بیماران، برحسب نیاز و براساس تشخیص پزشک، با یک پروتکل واحد درمان شدند و در یکی از گروه ها قرار گرفتند. اسکن DMSA، یک هفته پس از بستری برای بررسی ضایعات پارانشیم کلیه انجام شد (۲۱-۲۴). اسکن، با یک پروتکل واحد که شامل تعیین دوز با استفاده از سطح بدن کودک بود، انجام گرفت و ۴ ساعت بعد از تزریق، اسکن در نماهای خلفی- قدامی و مایل گرفته شد. اسکن نرمال با جذب طبیعی رادیواکتیو در کلیه تعریف شد. اسکن غیرطبیعی، با اختلال جذب (چند کانون یا یک کانون)، با یا بدون تغییر اندازه ای کلیه تعریف شد. تغییرات در پارانشیم کلیه با تعداد کانون های هیپوآکو تعریف شد. افتراق نهایی نوع عفونت ادراری، براساس تغییرات پارانشیم کلیه در اسکن DMSA بود. نمونه سرمی ایترولوکین ۸ در همه ای کودکان، قبل و ۳ روز بعد از شروع درمان با آنتی بیوتیک جمع آوری شد. این نمونه ها، پس از جمع آوری، منجمد و سانتریفیوژ شده و در دمای ۷۰- درجه ای سانتی گراد، تا زمان آزمایش نگهداری شدند. این نمونه های جمع آوری شده، طی چند مرحله به مرکز تحقیقات ایمونولوژی بیمارستان مسیح دانشوری وابسته به دانشگاه شهید بهشتی ارسال گردید و به روش الایزا با استفاده از کیت های در دسترس (کیت های الایزا ساخت شرکت پارس آزمون)، اندازه گیری شدند. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶، با سطح معنی داری ۰/۰۵ و آمار توصیفی (شاخص های مرکزی و پراکندگی جهت متغیرهای کمی و نیز با استفاده از جداول توزیع فراوانی جهت متغیرهای کیفی) و برای تعیین ارتباط میان متغیرهای مورد مطالعه، از آزمون های آماری

جدول ۱: توزیع (میانگین $\pm$ انحراف معیار) سطح سرمی اینترلوکین ۸ قبل و بعد از مداخله						
غلظت IL ۸	روز اول	روز سوم	میانگین	انحراف معیار	کمینه	بیشینه
			۲۷۵/۰۷	۲/۰۷	۱۱۶/۸۵	۲۰۰/۲۴
			۱۱۶/۵۳	۱/۱۵		
	روز اول	روز سوم				

جدول ۲: توزیع (میانگین $\pm$ انحراف معیار) سطح سرمی IL ۸ در کودکان مبتلا به عفونت دستگاه ادراری						
جنسیت	مقدار P	انحراف معیار	میانگین	مقدار P	انحراف معیار	میانگین
مذکر	۰/۱۱۸	۲۰۳/۹	۳۱۳/۷	۰/۱۱۸	۲۰۳/۹	۳۱۳/۷
مونث		۲۴۲/۶	۲۰۷/۹		۲۴۲/۶	۲۰۷/۹
سن	۰/۵۶۰	۲۲۹/۶	۲۷۰/۷	۰/۵۶۰	۲۲۹/۶	۲۷۰/۷
		۱۶۷/۷	۲۸۲/۴		۱۶۷/۷	۲۸۲/۴
نوع عفونت ادراری	۰/۰۰۱	۲۴۶/۰	۳۹۶/۱	۰/۰۰۱	۲۴۶/۰	۳۹۶/۱
		۱۱۳/۱	۱۸۷/۱		۱۱۳/۱	۱۸۷/۱

توزیع (میانگین $\pm$ انحراف معیار) سطح سرمی IL ۸، به تفکیک جنسیت افراد شرکت کننده در این مطالعه، در جدول ۲ آورده شده است. نتایج آزمون آماری مجذور کای نشان داد بین جنسیت افراد با غلظت IL ۸، رابطه‌ی معنی داری وجود نداشته است ($P=0/118$). توزیع (میانگین $\pm$ انحراف معیار) سطح سرمی IL ۸، به تفکیک گروه‌های سنی افراد شرکت کننده در این مطالعه، در جدول ۲ آورده شده است. نتایج آزمون آماری مجذور کای نشان داد بین گروه‌های سنی افراد با غلظت IL ۸، رابطه‌ی معنی داری وجود نداشته است ($P=0/560$). توزیع (میانگین $\pm$ انحراف معیار) سطح سرمی IL ۸، در بدو مطالعه، به تفکیک نوع عفونت ادراری افراد شرکت کننده در این مطالعه، در جدول ۲ آورده شده است. نتایج آزمون آماری مجذور کای نشان داد بین نوع عفونت ادراری افراد در بدو مطالعه، با غلظت IL ۸، رابطه‌ی معنی داری وجود داشت است ($P<0/001$)؛ به این معنی که در کودکان مبتلا به عفونت سیستم ادراری فوقانی، غلظت IL ۸ به طور معنی داری بیش تر از کودکان مبتلا به عفونت ادراری تحتانی بود ($259/7$ در عفونت سیستم ادراری فوقانی در مقابل $110/0$ در عفونت سیستم ادراری تحتانی و $P=0/001$).

بحث

عفونت ادراری، یکی از شایع ترین و مهم ترین بیماری ها در طب اطفال به شمار می رود که می تواند به عوارض جدی از جمله آسیب دائم کلیوی، نارسایی مزمن کلیه و حتی پرفشاری خون منجر گردد. هدف این مطالعه، بررسی تغییرات سطح سرمی اینترلوکین ۸ در عفونت های ادراری فوقانی و تحتانی و نیز، بررسی ارتباط آن با نوع عفونت بود ($259/7$). در یک مطالعه سطوح سرمی اینترلوکین ۸ در کودکان مبتلا به پیلونفریت، بالاتر از سطح سرمی آن در موارد درگیری سیستم تحتانی بود؛ بر اساس این تحقیق، سطح این سایتوکین ابزار تشخیصی مفیدی برای شناختن اولیه ی پیلونفریت در کودکان تب دار بود (24)؛ در مطالعه ی ما نیز سطح اینترلوکین ۸، دارای حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص

نوع عفونت ادراری بود، به نحوی که با استفاده از منحنی ROC سطح زیر منحنی در مورد اینترلوکین ۸ در تشخیص عفونت ادراری $0/673$ بود. همچنین سطح زیر منحنی ROC در مورد اینترلوکین ۸ در پیشگویی نتیجه ی اسکن DMSA $0/630$ بود. از آنجایی که هرچه سطح زیر منحنی به عدد ۱ نزدیکتر باشد به معنی پیشگویی قویتر است، چنین نتیجه گیری شد که اینترلوکین ۸ متغیری نسبتاً قوی برای پیشگویی عفونت سیستم ادراری و هم پیشگویی نتیجه ی اسکن و آسیب کلیوی است. بین غلظت اینترلوکین ۸ با جنسیت و با گروه سنی افراد رابطه ی معنی داری وجود نداشت (به ترتیب $P=0/118$ ، $P=0/560$). در مطالعه ی دیگر که در سال 2009 در تایوان انجام شد، نتایج نشان داد که سطح سرمی و ادراری اینترلوکین ۸ در کودکان مبتلا به پیلونفریت، نسبت به کودکان مبتلا به عفونت سیستم تحتانی به طور قابل توجهی بالاتر بوده است (۱۸) که این یافته، مشابه یافته های مطالعه ی ما بود. در مطالعه ی دیگر در سال 2012 در ایران، 84 کودک، در ۳ گروه با سابقه ی اسکار (پیلونفریت) و ریفلاکس، با سابقه ی اسکار (پیلونفریت) و بدون ریفلاکس، بدون سابقه ی اسکار (پیلونفریت) و ریفلاکس - وارد مطالعه شدند؛ نتایج این مطالعه نشان داد که سطح اینترلوکین ۸ در کودکانی که در گروه یک بررسی قرار داشتند، بالاتر از سایر گروه ها بود. بنابراین، نویسندگان این مطالعه چنین نتیجه گرفتند که اندازه گیری این سایتوکین می تواند به تعیین نوع درگیری عفونت ادراری و پیشگویی شدت ریفلاکس، کمک کند (20)؛ در مطالعاتی نیز که در نمونه های حیوانی انجام گرفته، اسکار کلیه بیش تر نتیجه ی التهاب حاد ناشی از سایتوکین های مذکور بوده تا وجود خود میکروارگانیزم (26 و 27). گذشته از این - ها سایتوکین های مختلف به ویژه IL ۸، منجر به آبسه و نکروز در ساختمان کلیه می شوند که با از بین رفتن آبسه های نکروتیک و ارتشاح نوتروفیلی با سلول های مونونوکلئوئر، پرولیفراسیون عروقی و فیروز، جایگزین می شود و در مدت نسبتاً کوتاهی، منجر به گسترش بافت اسکار در کلیه می گردد (16 و 17). این یافته ها بیان

بر IL۸ موارد دیگری مانند ریفلاکس وزیکویورتال، قدرت ایمنی بدن، استعداد ژنتیکی، تعداد و ویروالانس میکروارگانسم می‌توانند بر شدت اسکار کلیه موثر باشد (۳۰) که به علت هزینه‌های بالای انجام تست‌هایی مانند بیوپسی، امکان کنترل این عوامل مخدوش - گر به طور کامل وجود نداشت؛ هرچند، محققان، نهایت سعی خود را جهت یکسان‌سازی نمونه‌ها و جلوگیری از اختلال ناشی از عوامل مخدوش‌گر زمینه‌ای، به کار بستند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ایترولوکین ۸ از غلظت سرمی بالاتری در عفونت‌های ادراری فوقانی نسبت به عفونت‌های ادراری تحتانی برخوردار بود، در نتیجه از این آزمایش می‌توان به - عنوان جایگزین مناسبی برای اسکن DMSA، در پیش‌گویی نوع عفونت سیستم ادراری استفاده کرد. مطالعات با حجم نمونه‌ی بیشتر و گسترده تر جهت تایید موارد فوق توصیه می‌گردد.

قدردانی

از بیماران مشارکت کننده و کادر بیمارستان امیرالمومنین سمنان قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش، پس از کسب اجازه از کمیته‌ی اخلاق و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام شد.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

م. م. طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است.

می‌کند که تعدیل پاسخ‌های التهابی و مخصوصاً سطوح ایترولوکین - هایی مانند IL۸ در بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری و مخصوصاً عفونت‌های ادراری فوقانی، می‌تواند سبب کاهش بروز اسکار و عوارض همراه آن گردد. (۲۸). همچنین، لوکوترین ۸ فاکتور کموتاکتیکی است که در جریان التهاب و عفونت‌ها، از نوتروفیل‌های وابسته به مونوسیت‌ها آزاد می‌شود و به تمایز سلول - های مزانشیال می‌پردازد و در نتیجه، شدت آسیب بیش‌تری را بر روی کلیه برجای می‌گذارد (۲۹). بنابراین، چنین پیش‌بینی می‌شود که مشابه یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، IL۸ از غلظت بالاتری در عفونت‌های ادراری فوقانی نسبت به عفونت‌های ادراری تحتانی برخوردار باشد؛ به نحوی که با توجه به حساسیت و ویژگی نسبتاً بالای این ایترولوکین برای پیش‌گویی نوع عفونت سیستم ادراری (فوقانی و تحتانی)، شاید بتوان آن را به عنوان جایگزین مناسبی برای اسکن DMSA در پیش‌گویی نوع عفونت سیستم ادراری (فوقانی و تحتانی)، به کار برد. در مطالعه‌ی حاضر، در افراد مذکر شیوع عفونت ادراری فوقانی نسبت به عفونت ادراری تحتانی به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود ($P=0/049$ و $30/7\%$ در مقابل $69/2\%$ ؛ از طرفی، در افراد مونث نسبت به افراد مذکر، سطح سرمی ایترولوکین ۸ $313/7 \pm 203/9$ در مقابل $207/9 \pm 242/6$ کم‌تر بود. توجیه موارد بالا می‌تواند این باشد که در این مطالعه، شیوع عفونت ادراری تحتانی (سیستیت) در افراد مذکر بیش‌تر بوده است و از آنجایی که طبق مطالب ذکر شده، سطح سرمی ایترولوکین ۸ در عفونت‌های ادراری تحتانی کم‌تر از عفونت‌های ادراری فوقانی بوده است، دور از انتظار نبوده که افراد مذکر (که شیوع عفونت‌های ادراری تحتانی در آن‌ها بیش‌تر بوده است)، سطوح ایترولوکین کم - تری داشته باشند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در گروه سنی بیش‌تر از ۲۰ ماه نسبت به گروه دیگر، سطح سرمی ایترولوکین ۸ $282/4 \pm 167/7$ در مقابل $270/7 \pm 229/6$ بیش‌تر بوده است. Tullus و همکاران، ارتباطی بین سن و سطح سرمی ایترولوکین ۸ پیدا نکردند (۲۷) که این یافته، بر خلاف نتایج مطالعه‌ی ما بوده و می‌تواند به علت حجم نمونه‌ی محدودتر و تنوع کم‌تر در جامعه‌ی آماری مطالعه‌ی Tullus و همکاران نسبت به مطالعه‌ی ما بوده باشد. از طرفی، در مطالعه‌ی ما شیوع عفونت ادراری فوقانی در افراد با سن بیش‌تر از ۲۰ ماه بیش‌تر از گروه دیگر بوده است ($58/3\%$ در مقابل $41/7\%$). یکی از علل توجیه بالاتر بودن سطح سرمی ایترولوکین ۸ در کودکان با سن بالاتر نسبت به کودکان با سن کم‌تر، می‌تواند شیوع بالاتر عفونت‌های ادراری فوقانی در کودکان با سن بالاتر بوده باشد؛ به این معنی که به دلیل بالاتر بودن شیوع عفونت ادراری فوقانی در کودکان با سن بیش‌تر از ۲۰ ماه، طبق مطالب قبلی دور از انتظار نبوده است که سطوح سرمی ایترولوکین ۸ نیز در کودکان با سن بیش‌تر از ۲۰ ماه، بالاتر بوده باشد. از طرفی، نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌است که علاوه

References

1. Elder J S. Urinary tract infections. In: Behrman R E, Kliegman R M, Jenson H B, Stanton B F, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia, Saunders, 2008; PP: 2223-2228. doi: 10.1016/b978-1-4377-0755-7.00 532-7
2. Wald E R. Genitourinary tract infections. In: Feigin R D, Cherry J, Demmler G J, Kaplan S, editors. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Philadelphia, Saunders, 2004; PP: 536-555. doi: 10.1016/s0163-4453(04)0013 0-6
3. Davis C, Rantell A. Lower urinary tract infections in women. *Br J Nurs* 2017; **26**(9): S12-S19. doi: 10.12968/bjon.2017.26.9.S12.
4. Masajtis-Zagajewska A, Nowicki M. New markers of urinary tract infection. *Clin Chim Acta* 2017; **471**: 286-291. doi: 10.1016/j.cca.2017. 06.003.
5. Krzemien G, Roszkowska-Blaim M, Kostro I, Szmigielska A, Karpinska M, Sieniawska M, et al. Urinary levels of interleukin-6 and interleukin-8 in children with urinary tract infections to age 2. Medical science monitor. *International medical journal of experimental and clinical research* 2004; **10**(11): CR593-597. doi: 10.1097/01.ju.00 00180186.30175.27
6. Benador D, Benador N, Slosman D O, Nusslé D, Mermillod B, Girardin E. Cortical scintigraphy in the evaluation of renal parenchymal changes in children with pyelonephritis. *J Pediatrics* 1994; **124**: 17-20. doi: 10.1016/s0022-3476(94)70248-9
7. Rao W H, Evans G S, Finn A. The significance of interleukin 8 in urine. *Arch Dis Child* 2001; **85**: 256-262. doi: 10.1136/ad.85.3.256
8. Agace W, Connell H, Svanborg C, Harry L, Mobley T, Warren J W. Host Resistance to Urinary Tract Infection: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. Washington DC. *American Society for Microbiology* 1996; **12**: 221-243. doi: 10.1159/000061409
9. Agace W W, Hedges S R, Ceska M, Svanborg C. Interleukin- 8 and the neutrophil response to mucosal gram-negative infection. *J Clin Invest* 1993; **92**: 780-785. doi: 10.1172/jci116650
10. Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, Svanborg C. Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1993; **61**: 602-609. doi: 10.1007/978-1-4615-2952-1_31
11. Pohl H D, Rushton H G, Park J S, Chandra R, Majd M. Adjunctive oral corticosteroids reduce renal scarring: the piglet model of reflux and acute experimental pyelonephritis. *J Urol* 1999; **162**: 815-820. doi: 10.1097/00005392-199909 010-00067
12. Imamoglu M, Cay A, Cobanoglu U, Bahat E, Karahan C, Tosun I, et al. Effects of melatonin on suppression of renal scarring in experimental model of pyelonephritis. *Urology* 2006; **67**(6): 1315-1319.
13. Sener G, Tugtepe H, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Gedik N, Yegen B. Melatonin prevents neutrophil-mediated oxidative injury in *Escherichia coli*-induced pyelonephritis in rats. *J Pineal Res* 2006; **41**: 220-227. doi: 10.1111/j.16 00-079x.2006.00 357.x
14. Biyikli N K, Tugtepe H, Sener G, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Midillioglu S, et al. Oxytocin alleviates oxidative renal injury in pyelonephritic rats via a neutrophil-dependent mechanism. *Peptides* 2006; **27**(9): 2249-2257. doi: 10.1016/j. peptides.2006.03. 029
15. Tugtepe H, Sener G, Cetinel S, Velioglu-Ogunc A, Yegen B C. Oxidative renal damage in pyelonephritic rats is ameliorated by montelukast, a selective leukotriene CysLT1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2007; **557**: 69-75. doi: 10.1016/j. ejphar.2006.11.009
16. Masajtis-Zagajewska A, Nowicki M. New markers of urinary tract infection. *Clin Chim Acta* 2017; **471**: 286-291. doi: 10.1016/j.cca.2017.06. 003.
17. Meylan P R, Glauser M P. Failure of dexamethasone to prevent polymorph nuclear leukocyte infiltration during experimental acute exudative pyelonephritis and to reduce subsequent chronic scarring. *J Infect Dis* 1988; **157**: 480-485. doi: 10.1093/infdis/157.3.480
18. Taha A S, Grant V, Kelly R W. Urinalysis for interleukin-8 in the non-invasive diagnosis of acute and chronic inflammatory diseases. *Postgraduate medical journal* 2003; **79**(929): 159-163. doi: 10.1136/pmj. 79.929.159
19. Tramma D, Hatzistylianou M, Gerasimou G, Lafazanis V. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in the urine of children with renal scarring. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2012; **27**(9): 1525-1530. doi: 10.1007/s00467-012-2156-2
20. Merrikhi A R, Keivanfar M, Gheissari A, Mousavinasab F. Urine interleukin-8 as a diagnostic test for vesicoureteral reflux in children. *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association* 2012; **62** (3Suppl 2): S52-54. doi: 10.1007/978-3-540-35280-8_ 2647
21. Marild S, Jodal U. Incidence rate of first-time symptomatic urinary tract infection in children under 6 years of age. *Acta pediatrica* (Oslo, Norway) 1992; **87**(5): 549-552. doi: 10.1080/080352598501 58272
22. Jacobson SH, Eklof O, Eriksson C G, Lins LE, Tidgren B, Winberg J. Development of hypertension and uremia after pyelonephritis in childhood: 27 year follow up. *BMJ (Clinical research ed)* 1989; **299**(6701): 703-706. doi: 10.1136/bmj.299.6701.703

23. Krzemien G, Roszkowska-Blaim M, Kostro I, Szmigielska A, Karpinska M, Sieniawska M, et al. Urinary levels of interleukin-6 and interleukin-8 in children with urinary tract infections to age 2. *Medical science monitor. International medical journal of experimental and clinical research* 2004; **10**(11): CR593-597. doi: 10.1097/01.ju.0000180186.30175.27
24. Mohkam M, Karimi A, Karimi H, Sharifian M, Armin S, Dalirani R, et al. Urinary interleukin-8 in acute pyelonephritis of children: a before-after study. *Iranian journal of kidney diseases* 2008; **2**(4): 193-196. doi: 10.1007/s00467-008-0864-4
25. Sheu J N, Chen M C, Lue KH, Cheng S L, Lee I C, Chen S M, et al. Serum and urine levels of interleukin-6 and interleukin-8 in children with acute pyelonephritis. *Cytokine* 2006; **36**(5-6): 276-282. doi: 10.1016/j.cyto.2007.02.006
26. Chung VY1, Tai CK1, Fan CW1, Tang CN1. Severe acute pyelonephritis: a review of clinical outcome and risk factors for mortality. *Hong Kong Med J* 2014; **20**(4): 285-289. doi: 10.12809/hkmj134061
27. Shimamura T. Mechanisms of renal tissue destruction in an experimental acute pyelonephritis. *Exp Mol Pathol* 1981; **34**: 34-42. doi: 10.1016/0014-4800(81)90033-2
28. Rugo H, O Hanley P, Bishop A, Pearce M, Abrams J, Howard M. Local cytokine production in a murine model of Escherichia coli pyelonephritis. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1032-1039. doi: 10.1172/jci115644
29. Roilides E, Papachristou F, Gioulekas E, Tsapariou S, Karatzas N, Sotiriou J, et al. Increased urine interleukin-6 concentrations correlate with pyelonephritic changes on 99mTcdimecaptosuccinic acid scans in neonates with urinary tract infections. *J Infect Dis* 1999; **180**: 904-907. doi: 10.1086/314960
30. Schmodder R, Strieter R, Wiggins R, Chensue S, Kunkel S. In vitro and in vivo interleukin-8 production in human renal cortical epithelial. *Kidney Int* 1992; **41**: 191-198. doi: 10.1038/ki.1992.26

Original Article

Comparison of cartilage specific gene expression between condrcoyets treated with adipose derived stem cells supernatant and chondrocytes co-cultured with stem cells

Azadeh Montaseri^{1*}, Maryam Zeynali², Seyyedeh Mahdiyeh Hatami³, Maryam Hassan famian³

¹Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Genetics, Tabriz Azad University, Tabriz, Iran

³Department of Molecular Biology, School of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

*Corresponding author; E-mail: montaseri_azi@yahoo.com, montaseria@tbzmed.ac.ir

Received: 29 April 2017 Accepted: 18 June 2017 First Published online: 20 May 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):97-105

Abstract

Background: It has been accepted that different effects of stem cells can be contributed to their paracrine secretions into the supernatant. Accordingly, the goal of this study is to evaluate the probable effects of adipose derived stem cells (ASCs) supernatant on chondrocyte gene expression and to compare it with co-culture condition of chondrocyte and ASCs.

Methods: To evaluate the supernatant effects, chondrocyte at the second passage were treated with ASCs-supernatant for 72 hr. Co-culture of cells were performed by seeding the same number of chondrocytes and ASCs in culture flasks for 72 hr too. After this period, cells in both groups were prepared for evaluation of cartilage specific genes expression using Real time RT-PCR technique. Data were analyzed using Two-Way ANOVA and Tukey's post-test.

Results: Treatment of chondrocytes with ASCs supernatant resulted in significant increase in the expression of Collagen II and Sox-9, but that of the aggrecan and COMP did not change significantly.

Conclusion: ASCs supernatant can be a beneficial medium compared to the stem cells itself and can be introduced as a candidate for promotion of cartilage lesions healing.

Keyword: Chondrocyte, Cartilage, Stem Cells, Adipose Tissue, Gene.

How to cite this article: Montaseri A, Zeynali M, Hatami S.M, Hassan famian M. [Comparison of cartilage specific gene expression between condrcoyets treated with adipose derived stem cells supernatant and chondrocytes co-cultured with stem cells]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):97-105. Persian.

مقاله پژوهشی

مقایسه بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی توسط کندروسیت‌های تیمار شده با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی و کندروسیت‌های هم‌کشتی شده با سلول‌های بنیادی

آزاده منتصری^{۱*}، مریم زینالی^۲، سیده مهدیه حاتمی^۳، مریم حسن فامیان^۳

^۱مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی بند ناف، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۲گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، تبریز، ایران

^۳گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی اهر، ایران

*نویسنده مسئول؛ ایمیل: montaseri@tbzmed.ac.ir، montaseri_azi@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۸ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۹۷-۱۰۵

چکیده

زمینه: امروزه مشخص شده است که سلول‌های بنیادی عمده تأثیرات خود را از طریق ترشح فاکتورهای رشد متعدد در محیط کشت‌رویی (سوپرناتانت) اعمال می‌نمایند. بر این اساس هدف از طرح حاضر بررسی تأثیر سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی چربی بر بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی توسط کندروسیت‌ها و مقایسه آن با شرایطی است که کندروسیت‌ها به طور مستقیم (هم‌کشتی) در مجاورت سلول‌های بنیادی چربی قرار گیرند.

روش کار: جهت بررسی تأثیر سوپرناتانت، کندروسیت‌هایی که در پاساژ ۲ سلولی بودند به مدت ۷۲ ساعت تحت تیمار با سوپرناتانت حاصله از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی قرار گرفتند. در گروه هم‌کشتی، کندروسیت‌ها و سلول‌های بنیادی به نسبت مساوی و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط کشت قرار داده شدند. در پایان این زمان، سلول‌های هر دو گروه جهت بررسی بیان ژن‌های مختص غضروف با روش Real time RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده با روش آماری Two Way ANOVA و Tukey post test تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج طرح حاضر بیانگر افزایش بیان ژن‌های کلاژن نوع II و Sox-9 در گروه تیمار با سوپرناتانت در مقایسه با گروه هم‌کشتی بود، اما بیان ژن‌های Aggrecan و COMP تفاوت معنی‌داری را در دو گروه نشان نداد.

نتیجه‌گیری: استفاده از سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در مقایسه با استفاده مستقیم از خود این سلول‌ها می‌تواند اثرات سودمندتری داشته باشد و به عنوان گزینه مناسبی جهت پیشبرد ترمیم ضایعات غضروف مفصلی در نظر گرفته شود.

کلید واژه‌ها: کندروسیت، غضروف، سلول‌های بنیادی، بافت چربی، ژن.

نحوه استناد به این مقاله: منتصری آ، زینالی م، حاتمی س م، حسن فامیان م. مقایسه بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی توسط کندروسیت‌های تیمار شده با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی و کندروسیت‌های هم‌کشتی شده با سلول‌های بنیادی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۹۷-۱۰۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

غضروف مفصلی بافت همبند نیمه جامد و انعطاف‌پذیری است که به عنوان ضربه‌گیر مفاصل عمل می‌کند. این بافت متشکل از تعداد محدودی سلول به نام کندروسیت است که در ماتریکس خارج سلولی ظرفیتی که غنی از پروتئوگلیکان‌ها و رشته‌های کلاژن است قرار گرفته‌اند (۱). بافت غضروف فاقد عروق بوده و به دلیل فقدان خون‌رسانی و تعداد محدود سلول‌های موجود، این بافت توانایی کمی در تعمیر و بازسازی خود دارد و آسیب آن در نهایت منجر به اختلالات مفاصل می‌شود. ضایعات غضروف مفصلی در اثر عوامل مختلفی ایجاد می‌شوند، در ابتدا ضایعات مختصری مانند ترک‌ها و شکاف‌ها در غضروف مفصلی شکل می‌گیرند که به مرور زمان وسیع‌تر شده و به دنبال آن استئوآرتریت ایجاد می‌شود (۲،۱). استئوآرتریت شایع‌ترین بیماری درگیرکننده سیستم عضلانی-اسکلتی است که همراه با تخریب ماتریکس خارج سلولی، التهاب سینوویال و تخریب غضروف و استخوان زیرین می‌باشد (۳). در سطح مولکولی واسطه‌های پیش التهابی و کاتابولیک مانند اینترلوکین ۱- β (Interleukin 1- β) و فاکتور نکروز توموری آلفا (Tumor Necrosis Factor- α) در آغاز و پیشرفت بیماری دخیل هستند که منجر به فعالسازی مسیرهای التهابی و تحریک سنتز و ترشح آنزیمهای پروتئولیتیک مانند ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix metalloproteinases)، اگرکاناز و نیتریک اکسید می‌شوند که در نهایت تخریب ماتریکس خارج سلولی را به دنبال دارد (۴). تکنیک‌های رایج درمان آسیب‌های غضروف عبارتند از: روش خردکردن (Microfracture)، روش خراشیدن (Abrasion) و آرتروسکوپی (Arthroplasty). در طی چندین سال گذشته عمل پیوند سلول‌های غضروفی اتولوگ با نتایج امیدوارکننده‌ای همراه بوده است ولی این روش درمان دارای معایبی نیز می‌باشد از جمله از دست دادن فنوتیپ کندروسیت‌ها در محیط کشت تک لایه که شبیه به فیبروبلاست می‌شوند و همچنین عدم بیان کلاژن نوع II و آگریکان توسط کندروسیت‌های کشت داده شده در شرایط کشت طولانی مدت (۵). اخیراً در مهندسی بافت غضروف، برای رفع این محدودیت‌ها از منابع دیگری همچون سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شود. این سلول‌ها مجموعه‌ای ناهمگن از سلول‌های استرومایی هستند که می‌توان آن‌ها را از مغز استخوان، عضله اسکلتی، بافت چربی، سینوویوم و بند ناف جدا کرد (۳). در میان منابع مختلف، بافت چربی گزینه‌ای ایده‌آل برای تهیه سلول‌های بنیادی می‌باشد (۶). توزیع وسیع در بدن، دسترسی آسان و تعداد زیاد سلول‌های بنیادی که از این بافت به دست می‌آید، از جمله مزایای استفاده از این سلول‌ها می‌باشد (۷و۶). ذکر این نکته ضروری است که خوشبختانه، نه تنها پیوند اتوگراف بلکه به دلیل نداشتن آنتی‌ژن HLA-DR، پیوند آلوگراف سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

نیز بدون خطر رد پیوند و انتقال بیماری‌های واگیردار امکان‌پذیر است (۸). مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (Adipose derived stem cells, ASCs) در مقایسه با کندروسیت‌های کشت داده شده دارای توانایی بیشتری برای بیان ژن کلاژن نوع II حتی در پاساژهای سلولی بالا می‌باشند. از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که علی‌رغم توانایی‌های ذکر شده در رابطه با سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، این سلول‌ها زمانی قادر به تولید بافت غضروفی هستند که القاء کندروژنز در آن‌ها صورت گیرد که گاهی اوقات ادامه فرآیند القاء سلولی می‌تواند نتایج ناخواسته‌ای مثل هایپرتروفی سلول‌ها و ایجاد بافت کلسیفیه شده را به دنبال داشته باشد (۹). جهت غلبه بر این مشکل می‌توان از روش هم‌کشتی (co-culture) سلول‌های بنیادی چربی با کندروسیت‌ها استفاده نمود که در این شرایط هر دو سلول از اثرات یکدیگر بهره‌مند خواهند شد (۹و۱۰). علی‌رغم مزایای فراوان استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بسیاری از بیماری‌ها، این مسئله قابل توجه است که این سلول‌ها به دلیل خاصیت خود تجدیدی می‌توانند مانند سلول‌های سرطانی عمل کرده و در برخی موارد به دنبال کاشت در بدن، به سلول‌های توموری تبدیل شوند که این امر استفاده از سلول‌های بنیادی را با محدودیت مواجه کرده است (۱۰). محققین مختلف نشان دادند که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی اثرات خود را عمدتاً از طریق تولید و ترشح عوامل مختلف به صورت پاراکرین بروز می‌دهند بنابراین، سوپرناتانت سلول‌های بنیادی حاوی فاکتورهای متعددی است که توسط این سلول‌ها ترشح شده‌اند. در واقع این محیط شامل متابولیت‌ها، سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای رشد مانند TGF- β ، VEGF، FGF-2، IGF-1 می‌باشد که توسط سلول‌های بنیادی به محیط ترشح می‌شوند (۱۱). فاکتورهای رشد-IGF-1 و TGF- β باعث پیشبرد نسخه‌برداری کلاژن نوع II می‌شوند. این دو فاکتور رشد در سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی وجود داشته و سبب تسریع تحریک غضروف‌سازی می‌گردند (۱۲). بنابراین با توجه به حضور فاکتورهای تغذیه‌ای در محیط کشت به دست آمده از سلول‌های چربی (Adipose derived stem cells conditioned medium, ASC-CM) می‌توان به جای استفاده از سلول‌های بنیادی، از محیط کشت آن‌ها برای تحریک تکثیر و سنتز ماتریکس خارج سلولی توسط کندروسیت استفاده نمود (۱۳). با توجه به نتایج ضد و نقیض موجود در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی به صورت مستقیم و یا استفاده از محیط کشت آن‌ها، هدف از مطالعه حاضر مقایسه بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی شامل اگرکان، پروتئین cartilage oligomeric matrix protein (COMP)، کلاژن نوع II و Sox-9 توسط کندروسیت‌های تیمار

شده با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و کندروسیت‌هایی است که به‌طور مستقیم با سلول‌های بنیادی چربی هم کشتی داده شده‌اند.

روش کار

پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی از بیماران تحت جراحی تعویض مفصل، نمونه‌های غضروفی در لوله مخروطی حاوی بافر فسفات (Phosphate buffer saline, PBS) به آزمایشگاه کشت منتقل شده پس از چندین مرتبه شستشو نمونه‌ها داخل ظرف کشت قرار گرفته، به تکه‌های یک میلی‌متری قطعه قطعه شدند و سپس سه بار با بافر فسفات شستشوی آنها انجام گرفت. جهت هضم بافت غضروفی و جداسازی کندروسیت‌ها، ابتدا به قطعات غضروفی آنزیم پروناز ۱٪ اضافه گردید و حدود ۶۰ دقیقه در بن ماری شیکردار انکوبه شدند. سپس به مدت ۲-۶ ساعت نمونه‌های غضروفی در آنزیم کلاژناز ۰/۲٪ قرار داده شدند. پس از هضم عمده قطعات باقی، به منظور خشتی‌سازی آنزیم، محیط کشت حاوی FBS اضافه شد. جهت حذف قطعات هضم‌نشده، سوسپانسیون به دست آمده از صافی سلولی ۷۰ میکرون عبور داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ انجام گردید. کندروسیت‌های به دست آمده شمارش شده و با تراکم ۱۰^۵ سلول در فلاسک کشت T75 حاوی محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM) با ۱۰٪ (Fetal Bovine serum, FBS) و استرپتومایسین - پنی سیلین ۱٪ قرار داده شدند. کندروسیت‌ها پس از ۲۴ ساعت به کف فلاسک چسبیده و شروع به تکثیر نمودند. زمانی که ۸۰٪ از کف فلاسک توسط سلول‌ها اشغال گردید، سلول‌ها با استفاده از آنزیم EDTA - Trypsin از کف فلاسک جدا شده و پاساژ سلولی انجام گرفت. بافت چربی زیر جلدی با کسب رضایت‌نامه کتبی از بیمارانی که تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه کشت، نمونه چربی به دست‌آمده سه بار با PBS شستشو داده شد و با استفاده از تیغ بیستوری به تکه‌های کوچک بریده شد. پس از توزین، به ازای هر گرم از بافت چربی یک سی‌سی آنزیم کلاژناز نوع I (۰/۰۲٪) اضافه شد و به مدت ۶۰-۹۰ دقیقه در بن‌ماری شیکردار به منظور هضم بافت قرار داده شدند. پس از هضم کامل بافت به منظور خشتی‌سازی آنزیم، محیط کشت DMEM با FBS ۱۰٪ اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰ rpm سانتریفوژ انجام شد. سلول‌های بنیادی پس از جداسازی از بافت چربی شمارش شده و با تراکم ۱۰^۵ سلول در میلی‌متر مربع در فلاسک کشت T75 در محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک ۱٪ کشت داده شدند. سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت به کف فلاسک چسبیده شروع به تکثیر نمودند و زمانی که ۸۰٪ از کف فلاسک را پر کردند پاساژ سلولی انجام

شد. در این تحقیق سوپرناتانت یا conditioned medium (CM) از سلول‌های بنیادی بافت چربی که در پاساژ چهارم قرار داشتند جمع‌آوری شد. برای این منظور زمانی که سلول‌ها ۷۰٪ از کف ظرف را پر کردند، محیط کشت‌رویی آنها تخلیه شده، سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در معرض محیط کشت فاقد سرم قرار گرفتند. پس از این مدت سوپرناتانت جمع‌آوری شده و در ابتدا به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰rpm و سپس با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید تا هرگونه سلول یا قطعات سلولی اضافی از آن حذف شود، سپس تا زمان استفاده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری فاکتور رشد transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) موجود در سوپرناتانت به دست‌آمده از سلول‌های بنیادی چربی، از کیت BOSTER, CAT.NO: EKOSB, CA و جهت اندازه‌گیری فاکتور رشد Insulin-like (IGF-1) growth factor 1 موجود در سوپرناتانت از کیت BOSTER, CAT.NO: EKO382, CA استفاده شد. براساس پروتکل شرکت تولیدکننده، نمودارها و استاندارد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند و پس از آن آنتی‌بادی بیوتین‌بسته اضافه گردید (۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و سپس پلیت‌ها ۳ مرتبه با استفاده از TBS ۰/۰۱ مولار شستشو داده شدند. پس از اضافه کردن TMB به محض تغییر رنگ، محلول توقف اضافه شد و پس از آن نمونه‌ها در محل تاریک انکوبه شدند و نهایتاً جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader, Tecan, CH-8708, Australia) اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی اینکه آیا بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی در شرایط کشت کندروسیت‌ها در حضور محیط‌رویی (سوپرناتانت) جدا شده از سلول‌های بنیادی چربی (ASC-CM) دستخوش تغییر می‌شود و یا هم‌کشتی مستقیم کندروسیت‌ها با سلول‌های بنیادی چربی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن‌ها گردد، کندروسیت‌هایی که در پاساژ دوم سلولی بودند مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه هم‌کشتی، نسبت مساوی از سلول‌های کندروسیت (پاساژ دوم سلولی) و سلول‌های بنیادی چربی (پاساژ چهارم سلولی) با یکدیگر در فلاسک کشت T75 حاوی محیط کشت DMEM مکمل شده توسط ۱٪ آنتی‌بیوتیک و ۰/۰۵٪ FBS به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. در گروه تیمار با ASC-CM، کندروسیت‌های پاساژ دوم سلولی به تعداد ۱۰^۵ عدد در فلاسک T75 قرار داده شدند و پس از چسبیدن به کف فلاسک و رسیدن به حدود ۵۰-۶۰٪ confluency، محیط کشت‌رویی آنها برداشته شد و سلول‌ها در معرض محیط کشت جدا شده از سلول‌های بنیادی چربی (ASC-CM) به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. در پایان مدت ۷۲ ساعت، سلول‌ها با استفاده از آنزیم EDTA/trypsin برداشته شدند و جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real time RT-PCR، استخراج RNA آنها صورت گرفت. بررسی بیان ژن‌های Sox-9, collagen II, Aggrecan و COMP در هر دو گروه توسط Real time RT-PCR انجام شد. برای این منظور کل RNA

شماره A و B ۱ نتایج حاصل از این ارزیابی را توصیف می‌نماید. همانطور که در این تصویر مشاهده می‌شود میزان تولید و ترشح فاکتورهای رشد نامبرده با افزایش پاساژ سلولی، افزایش معنی‌داری داشته است. تصویر A- ۱ نشان می‌دهد که سطح IGF-1 در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که در پاساژ هفتم بوده‌اند به نسبت پاساژ چهارم به‌طور معنی‌داری ($P=0/004$) افزایش یافته است، همچنین میزان فاکتور رشد TGF- β در سلول‌های پاساژ هفت به نسبت پاساژ چهارم افزایش معنی‌داری ($P<0/01$) را نشان داد (تصویر B- ۱). تصویر شماره ۲ (A-D) نتایج حاصل از بررسی بیان ژنهای *Sox-9*, *Collagen II*, *Aggrecan* و *COMP* در سلول‌های هر دو گروه را نشان می‌دهد. همانطور که در تصویر- ۲A, B مشاهده می‌شود میزان بیان ژن *Aggrecan* (ACAN) و *COMP* در کندروسیت‌های هم‌کشتی شده با سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در مقایسه با کندروسیت‌هایی که تحت تیمار با سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی بافت چربی (ASC-CM) قرار گرفته بودند، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. تصویر C- ۲ بیان ژن کلاژن نوع II در دو گروه را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، در حضور ACS-CM بیان این ژن به‌طور معنی‌داری ($P=0/0004$) در مقایسه با گروه هم‌کشتی افزایش یافته است. همچنین تیمار کندروسیت‌ها با سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی منجر به افزایش معنی‌دار ($P=0/004$) بیان ژن *Sox-9* در مقایسه با گروه هم‌کشتی گردید (تصویر D- ۲). نتایج آماری از آنالیز داده‌های به دست آمده به‌طور کامل در جدول شماره ۲ نمایش داده شده‌اند.

سلول‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت یکتا تجهیز با Cat NO:YT9065) و براساس دستور کار مربوطه استخراج شد. تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه Nano drop 2000 تعیین گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت primer script RT reagent kit (Takara, RRO371, Japan) و براساس دستور کار ارائه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. واکنش SYBR Green PCR Master با استفاده از Real time RT-PCR Rotor Gene 6000 (Takara, RR82OL, Japan) Mix و دستگاه (Corbett, 010755, Australia) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و با زمان‌ها و درجه حرارت‌های مختلف (annealing temperature) برای هر ژن (جدول ۱) انجام شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای طراحی شده توسط نرم افزار Oligo7 که در این مطالعه استفاده شدند را نشان می‌دهد. از ژن بتا اکین (β -actin) به عنوان کنترل درونی استفاده شد و در نهایت سطح بیان هر کدام از ژن‌ها با استفاده از فرمول Pfaffl محاسبه شد. اعداد به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری Graph pad (version6) و با روش One-Way ANOVA و Tukey's Post test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در تمامی گروه‌ها P-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

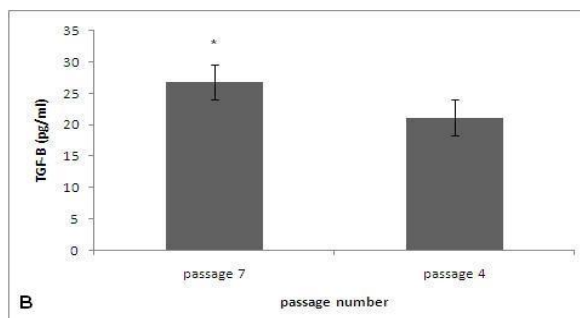
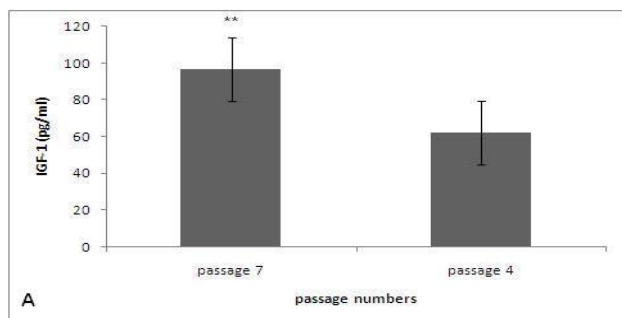
جهت بررسی تولید فاکتورهای رشد TGF- β و IGF-1 توسط سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی، سوپرناتانت به دست آمده از آنها با استفاده از روش ELISA اندازه‌گیری گردید. تصویر

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Real time RT-PCR

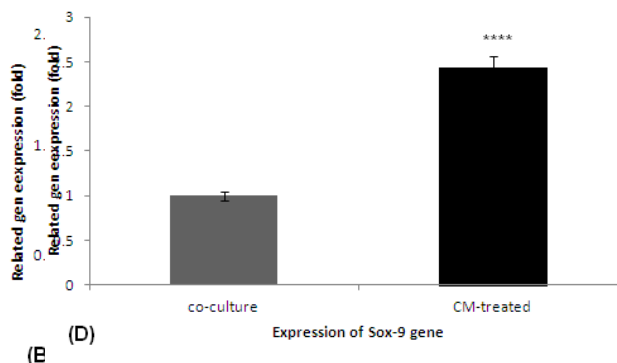
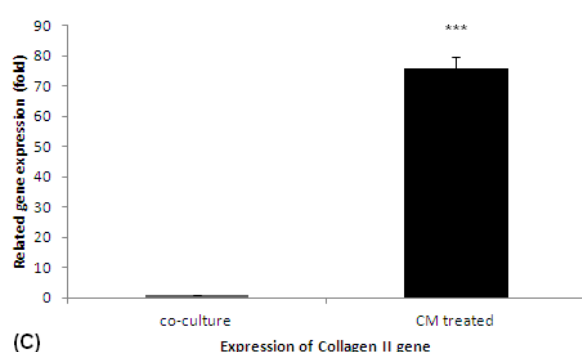
دمای Annealing	پرایمر	ژن
57°C for 30 sec	AGAGAGGACCAACCAGAATTC	Sox9-F
57°C for 30 sec	TGGGTAATGCGCTTGGATAG	Sox9-R
59°C for 30 sec	GGCAATAGCAGGTTTCACGTACA	Coll2-F
59°C for 30 sec	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT	Coll2-R
56°C for 30 sec	TGCAATGACACCATCCAG	Comp-F
56°C for 30 sec	ACACACACTTTATTTGTCTCTC	Comp-R
56°C for 30 sec	CAACTACCCGGCCATCC	ACAN-F
56°C for 30 sec	GATGGCTCTGTAATGGAACAC	ACAN-R
58°C for 45 sec	TCCTCCCTG GAG AAG AGC TA	B actin-F
58°C for 45 sec	TCA GGAGGA GCA ATG ATC TTG	B actin-R

جدول شماره ۲: نتایج به دست آمده از آنالیز آماری داده‌های حاصله از بیان ژن‌های مختص بافت غضروف بین گروه‌های مورد مطالعه

P-value	میانگین	انحراف معیار	گروه	ژن مورد مطالعه
0/001	۷۶/۰۸۱	۱۸/۹۹	هم‌کشتی	کلاژن نوع ۲
			تیمار با سوپرناتانت	
0/2	۲/۴۵۸	۱/۸۳۵	هم‌کشتی	آگرگان
			تیمار با سوپرناتانت	
0/4	۱/۸۷۸	۰/۸۹۴۲	هم‌کشتی	پروتئین الیگومریک غضروف
			تیمار با سوپرناتانت	
0/001	۲/۴۳۵۲	۰/۲۳۲۸	هم‌کشتی	ساکس-۹
			تیمار با سوپرناتانت	



نمودار ۱: اندازه‌گیری سطح فاکتورهای رشد (A) IGF-1 و (B) TGF-β ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در سوپرناتانت $P < 0.01$ و $P = 0.004$



نمودار ۲: بیان ژنهای (A) Aggrecan، (B) COMP، (C) کلاژن II و (D) Sox-9 در بین گروه تیمار با سوپرناتانت مشتق از سلول‌های بنیادی بافت چربی و گروه هم‌کشتی $P = 0.004$ و $P = 0.0001$

بحث

انتشار صورت می‌گیرد، بنابراین این سلول‌ها دارای توانایی اندکی جهت ترمیم آسیب ایجاد شده در غضروف هستند و در نتیجه پیشرفت این ضایعات به مرور زمان منجر به نازک‌شدن غضروف مفصلی، شکل‌گرفتن استخوان در محل آسیب دیده (استئوفیت) و آسیب سایر بافت‌های موجود در حفره مفصلی خواهد شد (۱۶). در چند دهه اخیر، استفاده از علم نوین مهندسی بافت جهت درمان آسیب‌های غضروف مفصلی به کار گرفته شده است. جهت انجام موفقیت‌آمیز مهندسی بافت غضروف، استفاده از منبع سلولی مناسب دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد (۱۷). سلول‌های کندروسیت با توجه به اینکه سلول‌های اصلی بافت غضروف هستند و قادر به تولید ماتریکس ویژه این بافت می‌باشند، به عنوان یک گزینه مناسب در نظر گرفته می‌شوند (۱۸). علی‌رغم مزایای فراوان، استفاده از کندروسیت‌ها محدودیت‌هایی را به همراه دارد که از جمله آنها می‌توان به مشکل و محدودیت در نمونه‌برداری از بافت غضروف، جراحی دو مرحله‌ای، توانایی محدود این سلول‌ها جهت تکثیر یافتن در شرایط آزمایشگاهی و از تمایز خارج شدن آنها (dedifferentiation) پس از چندین مرحله پاساژ سلولی اشاره

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌های کندروسیت با استفاده از سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی منجر به افزایش بیان ژن‌های کلاژن II و Sox-9 در این سلول‌ها در مقایسه با شرایطی می‌شود که کندروسیت‌ها به‌طور مستقیم در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی قرار گرفتند. همچنین این نتایج بیانگر تولید فاکتورهای رشد IGF-1 و TGF-β توسط سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بود که میزان ترشح این فاکتورها با افزایش پاساژ سلولی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. غضروف مفصلی بافت همبند تخصص یافته‌ای است که تنها دارای یک نوع سلول به نام کندروسیت (chondrocyte) می‌باشد و این سلول‌ها در بافت غضروف طبیعی، حفظ یکپارچگی ماتریکس خارج سلولی را عهده‌دار می‌باشند (۱۴). بیماری استئوآرتریت در نتیجه افزایش تولید فاکتورهای کاتابولیک مانند ایتروکین β -1 (IL-1β) و فاکتور نکروز توموری (TNF-α) و کاهش تولید فاکتورهای آنابولیک حاصل می‌شود که این عدم تعادل منجر به تخریب ماتریکس خارج سلولی غضروف می‌گردد (۱۵). با توجه به اینکه تغذیه کندروسیت‌ها از طریق پدیده

نمود (۱۹). با توجه به محدودیت‌های ذکر شده در به کار بردن کندروسیت‌ها، در طی سالیان اخیر تلاش محققین در جهت استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور درمان ضایعات غضروفی سوق داده شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابل استخراج شدن از منابع مختلفی همچون بافت چربی، مغز استخوان و بند ناف هستند. از بین منابع گوناگون، بافت چربی به دلیل در دسترس بودن، فراوان بودن سلول‌های بنیادی در آن و توانایی تمایز یافتن به کندروسیت‌ها، گزینه مناسبی به نظر می‌آید. مطالعات نشان داده‌اند که علی‌رغم داشتن مزایای متعدد، کاشت سلول‌های بنیادی در بدن بیماران می‌تواند عوارضی مانند تومورزایی را به دنبال داشته باشد (۲۰). با توجه نتایج ضد و نقیضی که در استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در هم‌کشتی با کندروسیت‌ها وجود دارد (۲۱)، در مطالعه حاضر ما بر آن شدیم تا مقایسه بین روش هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با کندروسیت‌ها و تیمار کندروسیت‌ها با سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی چربی را انجام دهیم. مطالعات متعددی نشان‌دهنده این مطلب هستند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثرات محرک خود بر کندروسیت‌ها را از طریق تولید فاکتورهای رشد به شکل سکروتوم و میکروویکول انجام می‌دهند (۲۲). بنابراین استفاده از سوپرناتانت این سلول‌ها می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبتری برای خود سلول‌های بنیادی در نظر گرفته شود. در مطالعه حاضر نیز به منظور بررسی توانایی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، میزان تولید فاکتورهای رشد IGF-1 و TGF- β در سوپرناتانت آنها سنجیده شد. نتایج نشان‌دهنده حضور فاکتورهای رشد نامبرده در سوپرناتانت و همچنین افزایش میزان آنها متناسب با افزایش تعداد پاساژ سلولی بود. در این مطالعه هم‌چنین مشخص گردید که در کندروسیت‌های تیمار شده با سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، میزان بیان ژن‌های مختص بافت غضروفی مانند کلاژن نوع II و Sox-9 در مقایسه با گروه هم‌کشتی افزایش معنی‌داری داشت، اما بیان ژن‌های COMP و Aggrecan در دو گروه تفاوتی را نشان نداد. فاکتور نسخه‌برداری Sox-9 یک مولکول کلیدی در طی فرآیند کندروژنز است که در سلول‌های اجدادی کندروسیت (Chondroprogenitors) و کندروسیت‌های بالغ بیان می‌شود و نقش مهمی در تمایز سلول‌های مزانشیمی به کندروسیت‌ها دارد (۲۳، ۲۴). حضور Sox-9 برای تنظیم تولید سایر اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن نوع II و Aggrecan ضروری است، همچنین این فاکتور نسخه‌برداری از حجیم شدن (hypertrophy) کندروسیت‌ها ممانعت به عمل می‌آورد (۲۵). مطالعه حاضر نشان داد که در حضور سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی میزان بیان ژن Sox-9 به طور معنی‌داری نسبت به زمانی که کندروسیت‌ها با سلول‌های بنیادی هم‌کشتی داده

می‌شوند افزایش یافت. این افزایش بیان ژن Sox-9 می‌تواند توجیه‌کننده افزایش بیان ژن کلاژن نوع II در گروه تیمار با سوپرناتانت نیز در نظر گرفته شود زیرا همانطور که ذکر گردید تنظیم بیان ژن کلاژن نوع II توسط فاکتور نسخه‌برداری Sox-9 در کندروسیت‌ها تنظیم می‌گردد. کلاژن نوع II یکی از عناصر اصلی تشکیل‌دهنده ماتریکس غضروف مفصلی است که منجر به ایجاد استحکام و سایر ویژگی‌های مکانیکی این بافت می‌شود (۲۶). بنابراین پیداکردن عاملی که بتواند منجر به افزایش توانایی کندروسیت‌ها در تولید این عامل شود از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. همانطور که قبلاً اشاره شد، سلول‌های بنیادی قادر به تولید و ترشح فاکتورهای رشد متعدد در سوپرناتانت روی خود می‌باشند بنابراین نتایج به دست آمده از این مطالعه را می‌توان به حضور فاکتورهای رشد آنابولیک در سوپرناتانت سلول‌های بنیادی به دست آمده از بافت چربی نسبت داد. مطالعه حاضر بیانگر حضور فاکتورهای رشد IGF-1 و TGF- β در سوپرناتانت این سلول‌ها بود که هر دوی آنها در تنظیم متابولیسم غضروف مفصلی نقش دارند (۱۵). از طرفی در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های COMP و Aggrecan در دو گروه مورد بررسی مشاهده نشد. Aggrecan پروتئولیکانی است که منجر به ایجاد استحکام و انعطاف‌پذیری در ماتریکس غضروف می‌شود و در بیماری استئوآرتریت تحت تاثیر آنزیم‌های تخریب‌کننده ماتریکس، ساختار آن دستخوش آسیب می‌شود (۲۷). جزء دیگر در ماتریکس خارج سلولی غضروف، مولکولی غیر کلاژنی به نام پروتئین الیگومریک ماتریکس غضروف (Cartilage oligomeric matrix protein-COMP) است که در ماتریکس زمینه‌ای غضروف قرار داشته و منجر به حفظ شبکه کلاژنی در ماتریکس این بافت می‌شود (۲۸). کاهش میزان بیان ژن‌های COMP و Aggrecan در کندروسیت‌های تحت تیمار با سوپرناتانت سلول‌های بنیادی به دست آمده از بافت چربی را می‌توان به قرار گرفتن این سلول‌ها در شرایط کشت تک لایه‌ای و هم‌چنین حضور فاکتورهای ناشناخته در سوپرناتانت نسبت داد. در راستای مطالعه حاضر، Lee و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی بافت چربی حاوی فاکتورهای رگ‌زایی (angiogenic factors) می‌باشد که می‌توان علت عدم افزایش در بیان ژن‌های نامبرده را به حضور این فاکتور نسبت داد (۲۱). بنابراین ضروری است که جهت بهینه ساختن سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی جهت استفاده در روش‌های مهندسی بافت غضروف، فاکتورهای مختلف موجود در آن را شناسایی نمود و عواملی را که می‌تواند منجر به حصول نتایج ناخواسته شوند از آن حذف کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از سوپرناتانت به دست آمده از سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با هم‌کشتی مستقیم این سلول‌ها می‌تواند منجر به افزایش بیان ژنهای مختص بافت غضروفی از جمله کلاژن نوع II و Sox-9 شود. بنابراین می‌توان از ترشحات پاراکرینی سلول‌های بنیادی به جای خود این سلول‌ها جهت پیشبرد ترمیم ضایعات غضروف مفصلی استفاده نمود که نسبت به استفاده مستقیم خود سلول‌ها دارای عوارض جانبی کمتری نیز می‌باشد.

قدردانی

بودجه اختصاص داده شده جهت انجام طرح حاضر توسط مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی بند ناف دانشگاه علوم پزشکی تبریز تامین شده است که بدینوسیله نویسندگان نهایت قدردانی خود را ابراز می‌دارند. لازم به ذکر است که مقاله حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی است که به عنوان پایاننامه خانم سیده مهدیه حاتمی دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی اهر با شماره ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۳۱۰۳۲ به ثبت رسیده است.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در یکصد و نود و هفتمین جلسه کمیته اخلاق مورخه ۱۳۹۴/۹/۱۶ مورد تایید قرار گرفته است.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرت ۵/۴/۱۳۹۶۶ از طرف مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت گرفته است.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

آ.م: طراحی تحقیق حاضر را به عهده داشته است. همچنین، همه مؤلفان اجرای مراحل آزمایشگاهی و جمع‌آوری داده‌ها را عهده‌دار بوده‌اند، همچنین نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

- Michael J, Schlüter-Brust K U, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 2010; **107**(9): 152-162. doi: 10.1055/s-0031-1275302
- Hoy D G, Smith E, Cross M, Sanchez-Riera L, Blyth F M, Buchbinder R, et al. Reflecting on the global burden of musculoskeletal conditions: lessons learnt from the Global Burden of Disease 2010 Study and the next steps forward. *Annals of the rheumatic diseases* 2014; annrheumdis-2014-205393. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205393.
- Montaseri A, Roshangar L, Rad J S, Shafaei H, Shakibaei M, Jarolmasjed S, et al. Formation of repaired hyaline cartilage using PDGF-treated chondrocyte/PCL construct in rabbit knee articular cartilage defect. doi: 10.1007/978-0-387-21553-2_11.
- Getgood A, Bhullar T, Rushton N. Current concepts in articular cartilage repair. *Orthopaedics and Trauma* 2009; **23**(3): 189-200. doi: 10.1016/j.mporth.2009.05.002.
- Chen Y, Ke J, Long X, Meng Q, Deng M, Fang W, et al. Insulin-like growth factor-1 boosts the developing process of condylar hyperplasia by stimulating chondrocytes proliferation. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; **20**(4): 279-287. doi: 10.1016/j.joca.2011.12.013.
- Kasir R, Vernekar V N, Laurencin C T. Regenerative engineering of cartilage using adipose-derived stem cells. *Regenerative engineering and translational medicine* 2015; **1**(1-4): 42-49. doi: 10.1007/s40883-015-0005-0
- Estes B T, Diekmann B O, Gimble J M, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nature protocols* 2010; **5**(7): 1294-1311. doi: 10.1038/nprot.2010.81
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British journal of haematology* 2005; **129**(1): 118-129. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x
- Meretoja V V, Dahlin R L, Kasper F K, Mikos A G. Enhanced chondrogenesis in co-cultures with articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2012; **33**(27): 6362-6369. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.042.
- Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**(6859): 105-111. doi: 10.1038/35102167
- Wu L, Leijten J C, Georgi N, Post J N, van Blitterswijk C A, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Engineering Part A* 2011; **17**(9-10): 1425-1436. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0517
- Van Buul G, Villafuertes E, Bos P, Waarsing J, Kops N, Narcisi R, et al. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; **20**(10): 1186-1196. doi: 10.1016/j.joca.2012.06.003.
- Friedenstein A J, Chailakhyan R K, Latsinik N V, Panasyuk A F, Keiliss-Borok I V. Stromal cells responsible

- for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; **17**(4): 331-340.
14. Bomer N, den Hollander W, Suchiman H, Houtman E, Sliker R, Heijmans B, et al. Neo-cartilage engineered from primary chondrocytes is epigenetically similar to autologous cartilage, in contrast to using mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016; **24**(8): 1423-1430. doi: 10.1016/j.joca.2016.03.009.
 15. Montaseri A, Busch F, Mobasher A, Buhrmann C, Aldinger C, Rad JS, et al. IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1 β -induced cartilage degradation through down-regulation of NF- κ B signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway. *PLoS One* 2011; **6**(12): e28663. doi: 10.1371/journal.pone.0028663.
 16. Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy—a review. *BMC musculoskeletal disorders* 2016; **17**(1): 230. doi: 10.1186/s12891-016-1085-9
 17. Platas J, Guillén M I, del Caz MDP, Gomar F, Castejón M A, Mirabet V, et al. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 2016; **8**(8): 1703. doi: 10.18632/aging.101007
 18. Kheir E, Shaw D. Management of articular cartilage defects. *Orthopaedics and Trauma* 2009; **23**(4): 266-273. doi: 10.1016/j.mporth.2009.01.013.
 19. Haleem A M, Chu C R. Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2010; **20**(2): 76-89. doi: 10.1053/j.oto.2009.10.004.
 20. Kwon SH, Bhang SH, Jang H-K, Rhim T, Kim B-S. Conditioned medium of adipose-derived stromal cell culture in three-dimensional bioreactors for enhanced wound healing. *Journal of Surgical Research* 2015; **194**(1): 8-17. doi: 10.1016/j.jss.2014.10.053.
 21. Lee C S, Burns O A, Raghuram V, Kalisvaart J, Boyan B D, Schwartz Z. Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. *Stem cell research & therapy* 2012; **3**(4): 35. doi: 10.1186/scrt126
 22. Pawitan J A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed research international* 2014; 2014. doi: 10.1155/2014/965849
 23. Shintani N, Kurth T, Hunziker E B. Expression of cartilage-related genes in bovine synovial tissue. *Journal of orthopaedic research* 2007; **25**(6): 813-819. doi: 10.1002/jor.20345
 24. Kawakami Y, Rodriguez-León J, Belmonte JCI. The role of TGF β s and Sox9 during limb chondrogenesis. *Current opinion in cell biology* 2006; **18**(6): 723-729. doi: 10.1016/j.ceb.2006.10.007.
 25. Kondo M, Yamaoka K, Tanaka Y. Acquiring chondrocyte phenotype from human mesenchymal stem cells under inflammatory conditions. *International journal of molecular sciences* 2014; **15**(11): 21270-21285. doi: 10.3390/ijms151121270.
 26. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell and tissue research* 2005; **319**(2): 243-253. doi: 10.1007/s00441-004-1012-5
 27. Kiani C, Liwen C, Wu Y J, Albert J Y, Burton B Y. Structure and function of aggrecan. *Cell research* 2002; **12**(1): 19-32. doi: 10.1038/sj.cr.7290106
 28. Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochemical Journal* 2001; **358**(1): 17-24. doi: 10.1042/bj3580017.

Original Article

Comparison of laryngoscopic view and intubation conditions in “BURP” and “Modified BURP” maneuvers

Farhad Mirzaei¹ , Samad Eslam Jamal Golzari^{2*} 

¹Department of Neurosurgery, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Anesthesiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: dr.golzari@hotmail.com

Received: 13 May 2017 Accepted: 18 July 2017 First Published online: 20 May 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):106-111

Abstract

Background: Role of anesthesiologist is important in difficult intubation and laryngoscopy and the role of an expert assistant performing the required maneuvers is important as well. Nevertheless, these maneuvers cannot be efficient during intubation in some cases because of inadequate experience of assistants. Therefore, in this study we compared the degree of laryngoscopic view and intubation condition using BURP and Modified BURP maneuvers.

Methods: Patients were randomly divided into two groups of study based on entering to the operation room. Premedication and induction of anesthesia were performed similarly in both groups. Later, laryngoscopy and intubation were performed. In control group, anesthesiologist recorded the visualized degree. Assistant was asked to perform maneuvers to improve laryngoscopic view. In case group, after recording the initial laryngoscopic view, anesthesiologist improved laryngoscopic view by his right hand and asked his assistant to intubate the patient. Then degree of improvement of visualization and success of intubation in two groups were compared.

Results: The mean time required for intubation was significantly more in the control group ($P < 0.001$). In case group, laryngoscopic view improved significantly more than the control group ($P = 0.005$). Nevertheless, the success of intubation was equal in both groups with no significant difference.

Conclusion: Findings of this study indicate that modified BURP provides better view of laryngoscopy compared to BURP. Both methods and maneuvers are equally effective regarding the success of intubation.

Keyword: BURP, Modified BURP, Intubation, Laryngoscopy.

How to cite this article: Mirzaei F, Jamal Golzari S E. [Comparison of laryngoscopic view and intubation conditions in “BURP” and “Modified BURP” maneuvers]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):106-111. Persian.

مقاله پژوهشی

مقایسه نمای لارنگوسکوپ و شرایط لوله گذاری با مانور BURP و Modified BURP

فرهاد میرزایی^۱، صمداسلام جمال گلزاری^{۲*}^۱گروه جراحی مغز و اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران^۲گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول: ایمیل: dr.golzari@hotmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۱۰۶-۱۱۱

چکیده

زمینه: علیرغم اینکه همراهی یک دستیار در طی انتوباسیون مشکل می تواند جهت انجام مانورهای لازم کمک کننده باشد، در بسیاری از موارد دستیاران نمی توانند بطور مؤثر در انتوباسیون مشکل کمک نمایند بنابراین در این مطالعه به مقایسه بهبود نمای لارنگوسکوپ با مانور BURP و Modified BURP پرداخته ایم.

روش کار: در گروه شاهد پس از انجام لارنگوسکوپ، درجه نمای لارنگوسکوپیک یادداشت شده و از دستیار درخواست شد تا توسط مانورهای مربوطه درجه نمای لارنگوسکوپیک را بهبود بخشد. در گروه مداخله، پس از ثبت نمای اولیه لارنگوسکوپیک، اقدام به انجام مانور جهت بهبود نمای لارنگوسکوپیک گردید و از دستیار خواسته شد تا انتوباسیون را انجام دهد و سپس میزان بهبود درجه نمای لارنگوسکوپیک در دو گروه مقایسه شد.

نتایج: متوسط زمان تا انجام انتوباسیون به طور معنی داری در گروه شاهد بیشتر از گروه مطالعه بود ($P > 0.001$). درجه نمای لارنگوسکوپیک بعد از انجام مانور در گروه کنترل بطور معنی داری بیشتر از گروه مداخله بود ($P=0.005$). در دو گروه تفاوت معنی داری از نظر تاثیر مانور بر میزان موفقیت بر انتوباسیون وجود نداشت.

نتیجه گیری: یافته های تحقیق حاضر حاکی از آنست که Modified BURP از نظر در اختیار قرار دادن نمای بهتر لارنگوسکوپیک، مؤثر تر از BURP می باشد ولی هر دو روش بر میزان موفقیت انتوباسیون به طور برابری تاثیر گذار هستند. کلید واژه ها: BURP، Modified BURP، انتوباسیون، لارنگوسکوپ

نحوه استناد به این مقاله: میرزایی ف، گلزاری ص ا ج. مقایسه نمای لارنگوسکوپ و شرایط لوله گذاری با مانور BURP و Modified BURP. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۱۰۶-۱۱۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

لارنگوسکوپي و انتوباسيون مشکل جزو مواردی هستند که در آنها نقش متخصص بیهوشی بارز می باشد. در بسیاری از موارد، انتوباسيون مشکل نیاز به کمک یک دستیار و یا همکار جهت انجام هر چه بهتر مانورهای لازم برای فراهم سازی شرایط مورد نیاز انتوباسيون دارد (Taguchi و همکاران). در طی انجام لارنگوسکوپي مستقیم راه هوایی مشکل، بعضی از مانورها توانایی تأثیرگذاری بر مشاهده گلو ت را دارند (Gentry و همکاران). پژوهش ها نشان داده اند که انجام مانور (backward, upward, rightward pressure) BURP موجب بهبود مشاهده لارنکس در طی انتوباسيون دهانی - حلقی مشکل میگردد (Krantz و همکاران). در این مانور غضروف تیروئید به صورت دورسال به نحوی جابجا می شود که لارنکس به جسم مهره گردنی فشرده شود و دید بهتری از لارنکس به شخص انتوبه کننده بدهد و در نهایت انتوباسيون راحت تری را در پی داشته باشد (Corda و همکاران). علیرغم اینکه همراهی یک دستیار در طی انتوباسيون مشکل میتواند جهت انجام مانورهای لازم بسیار کمک کننده باشد، در بسیاری از موارد به دلایل مختلف از قبیل عدم آشنایی کامل دستیار با نحوه انجام مانورها جهت بهبود نمای لارنگوسکوپیک، عملاً دستیاران نمیتوانند بطور مؤثر در انتوباسيون مشکل کمک نمایند (Asai و همکاران). در روش کلاسیک انتوباسيون دو نفره در موارد انتوباسيون مشکل، متخصص مربوطه با دست چپ خود عمل لارنگوسکوپي را انجام میدهد و در حالیکه لوله تراشه را در دست راست خود دارد از دستیار میخواهد تا با مانور BURP به بهبود نمای لارنگوسکوپي کمک نماید. بعد از حصول نمای مناسب جهت انتوباسيون، متخصص مربوطه انتوباسيون را انجام میدهد (Levitan و همکاران). علیرغم تمامی مزایا، این روش معایبی نیز دارد (Onda و همکاران). برای مثال، انجام دهنده مانور هیچ اطلاعی در خصوص جهت مناسب وارد سازی فشار و اندازه مناسب فشار وارد شده ندارد و این کار بیشتر بصورت کورکورانه انجام میگردد. در برخی موارد، با راهنماییهای متخصص مربوطه در خصوص جهت و میزان فشار اعمال گردیده، این مانور صورت میگیرد که میتواند بسیار زمانگیر و غیردقیق باشد (Snider و همکاران).

از دست دادن زمان در موارد انتوباسيون مشکل و بخصوص در مواردی که متخصص بدلائل مختلف نمیتواند بیمار را ونتیله نماید، میتواند منجر به عوارض بسیار خطرناک و حتی مرگ بیمار گردد و یا اینکه عوارض غیر قابل جبرانی بر روی سیستم اعصاب مرکزی بگذارد (Sun و همکاران). در مطالعه ای که توسط Asai و همکاران بر روی ۴۰ بیمار صورت گرفت، تأثیر اعمال فشار روی کریکوتید در تسهیل انتوباسيون بررسی گردید. بر اساس نتایج این پژوهش می توان اینطور نتیجه گیری کرد که فشار کریکوتید به

طور چشمگیر منجر به کاهش ونتیلیسیون کافی می گردد. همچنین در این تحقیق، محققین به این نتیجه رسیدند که فشار مداوم و غیردقیق بر روی ناحیه لارنژیال میتواند منجر به جاگذاری ناصحیح وسایل راه هوایی و عدم برقراری تهویه کافی در بیماران گردد (Asai و همکاران). در مطالعه مداخله ای تصادفی انجام شده توسط Levitan و همکاران بر روی ۱۰۶ جسد، درصد باز شدن ورودی گلو ت برای انواع لارنگوسکوپي ثبت شد (Levitan و همکاران). در یافته های این تحقیق، محققین به این نتیجه رسیدند که اعمال فشار در لارنگوسکوپي دو دستی در ناحیه لارنژیال، اگر توسط دو نفر انجام گیرد موجب بهبود بیشتر در نمای لارنگوسکوپي نسبت به زمانی که اعمال فشار توسط یک نفر انجام میگردد خواهد شد. در مطالعه ای که توسط Onda و همکاران بر روی ۳۷ رزیدنت بیهوشی و ۱۶ متخصص بیهوشی انجام گرفت، محققین به این نتیجه رسیدند که انجام مانور "BURP" میتواند مؤثر باشد و حتی رزیدنتهای کم تجربه نیز میتوانند بصورت مؤثر از این مانور استفاده نمایند. هر چند که بر اساس تأکید این پژوهش، مهارت در انجام هر چه صحیحتر این مانور، با افزایش تعداد انجام مانورها و آموزش در این خصوص افزایش میابد (Onda و همکاران). در مطالعه ای مشابه، Snider و همکاران، ۴۳ بیمار را که تحت بیهوشی عمومی قرار گرفته بودند، مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که اعمال فشار بر روی ناحیه لارنژیال بطور همزمان با اعمال مانور BURP میتواند منجر به کاهش دید ناحیه گلو ت گردد و در نتیجه انتوباسيون را به تأخیر بیندازد. بنابراین اعمال ناصحیح هر نوع مانور در ناحیه لارنژیال میتواند در پروسه انتوباسيون مشکلی جدی ایجاد نماید (Snider و همکاران).

روش کار

بیماران واجد شرایط ورود به مطالعه بصورت تصادفی بر حسب ورود به اتاق عمل، وارد دو گروه مطالعه گردیدند. در تمامی بیماران روش پیش درمانی و القاء بیهوشی یکسان انجام گردید. جهت انجام پیش درمانی از میدازولام (0.02 mg/kg) و فنتانیل ($1 \mu\text{g/kg}$) استفاده شد. جهت انجام القاء بیهوشی از پروپوفول ($1-2.5 \text{ mg/kg}$) و آتراکوریوم ($0.5-0.6 \text{ mg/kg}$) استفاده گردید. پس از حصول عمق بیهوشی مناسب، اقدام به لارنگوسکوپي و انتوباسيون گردید. در گروه شاهد (روش مرسوم)، متخصص بیهوشی لارنگوسکوپي کرده و درجه نمای لارنگوسکوپیک مشاهده شده را براساس معیارهای Cormack-Lehane یادداشت نمود. سپس از دستیار درخواست گردید تا با اعمال مانور "BURP" در بهبود درجه نمای لارنگوسکوپیک تلاش نماید. متعاقباً درجه نمای لارنگوسکوپیک حاصله یادداشت گردید. سپس

۰/۰۵ به صورت معنی دار در نظر گرفته شد. برای مقایسه درجه نمای لارنگوسکوپی در دو گروه مطالعه و شاهد از آزمون من ویتنی یو استفاده شد و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به صورت معنی دار در نظر گرفته شد. مطالعه حاضر تحت شماره IRCT2015012520795N1 ثبت گردیده است.

نتایج: از نظر توزیع جنسی و سنی بین گروه های مورد مطالعه تفاوت معنی داری وجود نداشت. در گروه شاهد متوسط زمان تا انجام انتوباسیون ۱۹/۶۲ ثانیه با انحراف معیار ۷/۴۷ ثانیه بود که کمترین زمان ۷ و بیشترین زمان ۴۵ ثانیه بود. این میزان در گروه مطالعه ۱۳/۲۲ و انحراف معیار ۶/۱۸ ثانیه بود که کمترین زمان ۷ و بیشترین زمان ۲۸ ثانیه بود. بین متوسط زمانی تا انجام انتوباسیون در گروه مورد و شاهد تفاوت چشمگیری وجود داشت و این میزان به طور معنی داری در گروه شاهد بیشتر از گروه مطالعه بود و مقدار P به اندازه کمتر از ۰/۰۰۱ محاسبه شد. لازم به ذکر است که در تمامی موارد انتوباسیون موفق بود و موردی از شکست در انتوباسیون وجود نداشت. در بین بیماران گروه شاهد که نمای لارنگوسکوپی آنها قبل از انجام مانور مورد بررسی قرار گرفته بود، ۳ بیمار در محدوده Grade1 (۷/۵٪)، ۱۴ بیمار در محدوده Grade2a (۳۵٪)، ۱۰ بیمار در محدوده Grade2b (۲۵٪)، ۱۲ بیمار در محدوده Grade3 (۳۰٪) و ۱ بیمار در محدوده Grade4 (۲/۵٪) قرار داشتند. در بین بیماران گروه شاهد که نمای لارنگوسکوپی آنها بعد از انجام مانور مورد بررسی قرار گرفته بود، ۲۲ بیمار در محدوده Grade1 (۵۵٪)، ۱۱ بیمار در محدوده Grade2a (۲۷/۵٪)، ۶ بیمار در محدوده Grade2b (۱۵٪) و ۱ بیمار در محدوده Grade3 (۲/۵٪) قرار داشتند. در بین بیماران گروه شاهد از نظر درجه نمای لارنگوسکوپی قبل و بعد از مانور تفاوت معنی داری وجود داشت به صورتیکه مقدار P به اندازه کمتر از ۰/۰۰۱ محاسبه گردید.

در بین بیماران گروه مطالعه که نمای لارنگوسکوپی آنها قبل از انجام مانور مورد بررسی قرار گرفته بود، ۲۴ بیمار در محدوده Grade1 (۶۰٪)، ۹ بیمار در محدوده Grade2a (۲۲/۵٪)، ۵ بیمار در محدوده Grade2b (۱۲/۵٪) و ۲ بیمار در محدوده Grade3 (۵٪) قرار داشتند. در بین بیماران گروه مطالعه که نمای لارنگوسکوپی آنها بعد از انجام مانور مورد بررسی قرار گرفته بود، ۲۸ بیمار در محدوده Grade1 (۷۰٪)، ۸ بیمار در محدوده Grade2a (۲۰٪)، ۳ بیمار در محدوده Grade2b (۷/۵٪) و ۱ بیمار در محدوده Grade3 (۲/۵٪) قرار داشتند. در بین بیماران مورد مطالعه از نظر درجه نمای لارنگوسکوپی قبل و بعد از مانور تفاوت معنی داری وجود داشت به صورتیکه مقدار P به اندازه ۰/۰۰۵ محاسبه گردید.

بر اساس مقایسه صورت گرفته در دو گروه، از نظر درجه نمای لارنگوسکوپی قبل از انجام مانور، بین دو گروه مورد طور تفاوت معنی داری وجود نداشت. این در حالی بود که پس از انجام مانور،

متخصص بیهوشی اقدام به انتوباسیون بیمار نمود. موفقیت و یا عدم موفقیت در انتوباسیون و هم چنین مدت زمان طی گردیده از لحظه شروع لارنگوسکوپی تا حصول اطمینان از انتوباسیون یادداشت گردید. در گروه مداخله، پس از انجام پیش درمانی و القاء بیهوشی، متخصص بیهوشی اقدام به لارنگوسکوپی نمود. نمای اولیه لارنگوسکوپی یادداشت گردید. سپس متخصص بیهوشی با دست راست خود اقدام به انجام مانور "BURP" جهت بهبود نمای لارنگوسکوپی نمود. نمای لارنگوسکوپی حاصله یادداشت گردید و در حالیکه متخصص زمینه را برای انجام انتوباسیون توسط دستیار فراهم ساخته بود، از دستیار خواست تا انتوباسیون را انجام دهد. موفقیت در انتوباسیون و مدت زمان لازم از ابتدای شروع لارنگوسکوپی تا حصول اطمینان از انتوباسیون موفق یادداشت شد. در انتها میزان بهبود و ارتقای درجه نمای لارنگوسکوپی و میزان موفقیت در انتوباسیون بین دو گروه مقایسه گردید. جامعه آماری مورد مطالعه در این پژوهش بیماران کاندید جراحی تحت بیهوشی عمومی بودند. حجم نمونه با توجه به در نظر گرفتن نمای لارنگوسکوپی به عنوان پیامد اولیه و با در نظر گرفتن مقدار آلفای ۰/۰۵ و توان ۸۰٪ و حداکثر خطای قابل قبول ۰/۰۶، برای هر گروه ۳۶ بیمار به دست آمد که با در نظر گرفتن احتمال ترک مطالعه توسط بیماران و یا کافی نبودن اطلاعات ثبت شده در این خصوص تعداد ۸۰ بیمار وارد مطالعه شدند. روش نمونه گیری به صورت کاملاً تصادفی بود و بعد از تعیین حجم نمونه، بیماران با استفاده از نرم افزار Randlist در دو گروه مساوی قرار گرفتند. جهت بررسی و مقایسه پیامدهای مخدوش کننده و مداخله گر بلوک های ۴ و ۶ تایی در نظر گرفته شد. معیارهای ورود؛ تمامی بیمارانی که در فاصله بهمن ماه ۱۳۹۳ لغایت فروردین ۱۳۹۵ تحت اعمال جراحی الکتیو تحت بیهوشی عمومی و انتوباسیون داخل تراشه قرار گرفتند و همچنین تمایل به شرکت در مطالعه داشتند. معیارهای خروج؛ اعمال جراحی اورژانس، بیماران با آنومالیهای صورت و گردن و یا راه هوایی، بیماران با سابقه شناخته شده راه هوایی مشکل، بیماران با توده راه هوایی شناخته شده، بیماران با سابقه بیماریهای سیستمیک از قبیل دیابت و آرتریت روماتوئید و بیماران با BMI ≥ 30 . پس از جمع آوری داده ها، اطلاعات هر یک از چک لیست ها وارد نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ گردیده و روش های آمار توصیفی برای آنالیز متغیرهای دموگرافیک استفاده گردید (میانگین، میانه، درصد و ...). جهت مقایسه متغیرهای کیفی بین گروه های مورد مطالعه، از آزمون مجذور کای استفاده گردید. همچنین برای مقایسه متغیرهای کمی بین گروه های مورد مطالعه، از آزمون تی مستقل استفاده شد و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. برای مقایسه درجه نمای لارنگوسکوپی قبل و بعد از انجام مانور در هر دو گروه، از آزمون ویل کاکسون استفاده شد و مقدار P کمتر از

درجه نمای لارنگوسکوپیک در دو گروه با یکدیگر تفاوت معنی داری داشت و مقدار P به اندازه کمتر از ۰/۰۰۱ محاسبه گردید.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که مانور Modified BURP روشی مناسب برای صرفه جویی در زمان تا انجام انتوباسیون می باشد. بر اساس نتایج این تحقیق، مدت زمان لازم تا انجام انتوباسیون در گروه Modified BURP نسبت به گروه BURP کمتر بود و به طور قابل توجهی منجر به صرفه جویی در زمان و پیشگیری از عوارض متعاقب تاخیر در انتوباسیون می گردد. مطالعات مختلف نشان داده اند که از دست دادن زمان در موارد انتوباسیون مشکل و در مواردی که متخصص بیهوشی به هر دلیلی نتواند بیمار را و نیتله نماید منجر به عوارض بسیار خطرناک و حتی مرگ بیمار میشود (Takahata و همکاران). مهمتر اینکه تاخیر در انجام انتوباسیون ممکن است عوارض جبران ناپذیری را بر روی سیستم عصبی مرکزی در پی داشته باشد (Knopp و همکاران). در قسمت نتایج این تحقیق اشاره گردید که قبل از انجام مانور، از نظر درجه نمای لارنگوسکوپیک در دو گروه تفاوت معنی داری وجود نداشت که این مسئله می تواند تقسیم بندی صحیح دو گروه مورد مطالعه را به طور تصادفی به دو گروه مورد و شاهد نشان دهد و موید تصادفی سازی مناسب در بین دو گروه باشد. البته در خصوص همسان سازی دو گروه از نظر سایر متغیر های زمینه ای همچون سن و جنس نیز بررسی آماری صورت گرفت که نتایج حاکی از عدم وجود تفاوت معنی دار در دو گروه و به تبع آن نشانگر تصادفی سازی مناسب گروه های مورد مطالعه می باشد. پس از انجام مانور مورد نظر در گروه های مطالعه و شاهد، از نظر درجه نمای لارنگوسکوپیک تفاوتی معنی دار یافت شد و در گروه مطالعه به نمای بهتری دست یافتیم. این مسئله می تواند نمایانگر اثر بخشی بهتر مانور انجام شده در گروه مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد باشد. برای اینکه بتوانیم به طور خاص اثر مانور اعمال شده را بدست آوریم، در یک آنالیز جداگانه تحت عنوان اثر مانور که مقدار P آن در قسمت نتایج ذکر شده است، به تاثیر مانور Modified BURP پرداختیم که متعاقبا اثر بخشی مانور به طور مجدد اثبات گردید. در تحقیقی که توسط Takahata و همکارانش انجام گرفت، میزان اثر بخشی مانور BURP در بهبود درجه نمای لارنگوسکوپیک بررسی شد (Takahata و همکاران). در تحقیق فوق الذکر، بیمارانی که در Grade 1 نمای لارنگوسکوپیک قرار داشتند، تحت انجام مانور قرار نگرفته بودند ولی در مطالعه ما این افراد نیز مورد بررسی و تحت اعمال مانور -در هر دو گروه مطالعه و شاهد- قرار گرفتند. در تحقیق فوق، پس از انجام مانور، نمای لارنگوسکوپیک به طور کاملا چشمگیری از نمای اولیه بهتر شده

بود و درجه نمای لارنگوسکوپیک به طور معنی داری کاهش یافته بود (Takahata و همکاران). این مطلب همراستا با یافته های پژوهش حاضر می باشد که نشان داد مانور BURP به طور چشمگیری در بهبود نمای لارنگوسکوپیک تاثیر دارد.

بایستی به این مهم اشاره نمود که هر دو مانور -BURP و Modified BURP- در بهبود نمای لارنگوسکوپیک تاثیر داشتند و پس از انجام و اعمال مانورها، نمای لارنگوسکوپیک به طور معنی داری بهبود یافت اما درجه بهبودی نما، در بیماران گروه مطالعه که مانور Modified BURP بر روی آنان انجام شده بود، بهتر از گروه شاهد بود که مانور BURP بر روی آنان انجام شده بود. نتیجه گیری و استنباط کلی منتج از این مطالب آن است که مانور BURP به تنهایی در بهبود درجه نمای لارنگوسکوپیک تاثیر گذار است ولی در مقایسه با Modified BURP اثربخشی کمتری دارد.

نتیجه گیری

یافته های مطالعه حاضر نشان داد که علی رغم عدم تفاوت مانور های BURP و Modified BURP در خصوص موفقیت در انتوباسیون، روش Modified BURP به طور کاملا چشمگیری تاثیر بیشتر و بهتری از روش BURP بر درجه نمای لارنگوسکوپیک و کاهش زمان انتوباسیون دارد.

قدردانی

با تشکر از تمامی دست اندارکاری که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند.

ملاحظات اخلاقی

کد اخلاقی TBZMED.REC.1394.426

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می دارد که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

ف م و ص ا و همکاران همگی طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. ف م و ص ا و همکاران همگی همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند.

References

1. Taguchi S, Kusunoki S, Tanigawa K, Kawamoto M. Survey of skills needed to assist tracheal intubation: nurse assistants lack accurate knowledge of BURP and cricoid pressure maneuvers. *Masui* 2010; **59**(8): 954-956.
2. Gentry WB, Shanks CA. Reevaluation of a maneuver to visualize the anterior larynx after intubation. *AnesthAnalg* 1993; **77**(1): 161-163. doi: 10.1213/0000539-199307000-00031
3. Krantz M A, Poulos J G, Chaouki K, Adamek P. The laryngeal lift: a method to facilitate endotracheal intubation. *J ClinAnesth* 1993; **5**(4): 297-301. doi: 10.1016/0952-8180(93)90122-u
4. Corda D M, Riutort K T, Leone A J, Qureshi M K, Heckman M G, Brull S J. Effect of jaw thrust and cricoid pressure maneuvers on glottic visualization during GlideScopevideolaryngoscopy. *J Anesth* 2012; **26**(3): 362-368. doi: 10.1007/s00540-012-1339-0
5. Asai T, Goy RW, Liu EH. Cricoid pressure prevents placement of the laryngeal tube and laryngeal tube-suction II. *Br J Anaesth* 2007; **99**(2): 282-285. doi: 10.1093/bja/aem159
6. Levitan R M, Kinkle W C, Levin W J, Everett W W. Laryngeal view during laryngoscopy: A randomized trial comparing cricoid pressure, backward-upward-rightward pressure, and bimanual laryngoscopy. *Annals of Emergency Medicine* 2006; **47**: 548-562. doi: 10.1016/j.annemergmed.2006.01.013
7. Onda M, Inomata S, Satsumae T, Tanaka M. The efficacy of the "BURP" maneuver during laryngoscopy and training period necessary for residents in anesthesiology. *Masui* 2012; **61**(4): 444-447.
8. Snider D D, Clarke D, Finucane BT. The "BURP" maneuver worsens the glottic view when applied in combination with cricoid pressure. *Can J Anaesth* 2005; **52**(1): 100-104. doi: 10.1007/bf03018589
9. Sun D A, Warriner C B, Parsons D G, Klein R, Umadaly H S, Moulton M. The GlideScope video laryngoscope: randomized clinical trial in 200 patients. *Br J Anaesth* 2005; **94**(3): 381-384. doi: 10.1093/bja/aei041
10. Takahata O, Kubota M, Mamiya K, Akama Y, Nozaka T, Matsumoto H, et al. The efficacy of "BURP" maneuvers during a difficult laryngoscopy. *AnesthAnalg* 1997; **84**: 419-421. doi: 10.1097/00132586-199802000-00050
11. Knopp R K. External laryngeal manipulation: A simple intervention for difficult intubations. *Annals of emergency medicine* 2002; **40**(1): 38-40. doi: 10.1067/mem.2002.125058