

Effect of 8-weeks hydroalcoholic extracts of dill supplementation along with aerobic training on lipid profile in hyperlipidemic obese men

Alireza Ostadrahimi¹, Bahram Jamali Qarakhanlou^{2*}, Akram Ameghani³, Ali Zarghami Khameneh⁴

¹Nutrition Research Center, School of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Basic Sciences, School of Paramedical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Physical Education, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Department of Exercise & Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: jamalib@tbzmed.ac.ir

Received: 22 August 2017 Accepted: 4 November 2017 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):7-15

Abstract

Background: In traditional medicine, Dill has been used for the treatment of gastrointestinal disorder and also for its hypoglycemic and lipid lowering effects. So, the aim of this study was to determining effect of long-term dill extract supplementation alone and along with regular aerobic training on lipid profile in serum of men hyperlipidemic patients.

Methods: 60 male patients with hyperlipidemia after completing consent forms were randomized divided into four homogeneous groups; control, aerobic training, dill extract, and aerobic training along with dill extract. Furthermore, consumption of oral dill essential oil (2 mg.kg⁻¹.day) along with aerobic exercise training protocol for 8-weeks performed (sessions were conducted 3 times a week, each lasting 45 minutes running on the treadmill). Blood samples were taken at two phases (48 hours before and after the last training session protocol) were collected.

Results: The levels of the total cholesterol and triglyceride in the experimental groups significantly decreased in compared the pre-intervention period ($P<0.032$). In addition, -22.75% decreasing in LDL-cholesterol and +49.76% increasing in HDL-cholesterol levels just in the aerobic exercise training along with dill extract was significant in comparison with the control group ($P=0.001$).

Conclusion: The combination effects of regular aerobic training and dill supplementation, due to having additive effects in compared to treatment with dill supplementation and aerobic activity alone, more effective treatment methods to improve the lipid profile factors in associated with hyperlipidemia.

Keyword: Dill, Aerobic Training, Hyperlipidaemia.

How to cite this article: Ostadrahimi A R, Jamali Qarakhanlou B, Ameghani A, Zarghami Khameneh A. [Effect of 8-weeks hydroalcoholic extracts of dill supplementation along with aerobic training on lipid profile in hyperlipidemic obese men]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):7-15. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر هشت هفته مکمل‌دهی عصاره آبی-الکلی شوید همراه با تمرینات هوازی بر پروفایل لیپیدی مردان چاق مبتلا به هیپرلیپیدمی

علیرضا استاد رحیمی^۱، بهرام جمالی قراخلو^{۲*}، اکرم آقانی^۳، علی ضرغامی خامنه^۴

^۱مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۲گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳مدیریت تربیت بدنی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول: ایمیل jamalib@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۷-۱۵

چکیده

زمینه: در طب سنتی، از شوید برای درمان اختلالات دستگاه گوارشی و اثرات کاهنده قندخون و چربی آن استفاده می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، تعیین اثرات ترکیبی مکمل‌دهی عصاره شوید به تنهایی و همراه با تمرینات منظم هوازی بر شاخص‌های پروفایل لیپیدی در سرم مردان مبتلا به هیپرلیپیدمی بود.

روش کار: تعداد ۶۰ مرد مبتلا به هیپرلیپیدمی پس از اخذ رضایت‌نامه بطور تصادفی به چهار گروه همگن شامل: کنترل، تمرین هوازی، عصاره شوید و تمرین هوازی همراه با عصاره شوید تقسیم شدند. مصرف خوراکی اسانس شوید ($2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}$) به مدت هشت هفته همراه با پروتکل تمرینی (۳ جلسه در هفته و هر جلسه ۴۵ دقیقه دویدن روی نوارگردان) بود. نمونه‌های خونی در طی دو مرحله (۴۸ ساعت پیش و پس از آخرین جلسه تمرین) جمع‌آوری شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های تحلیل واریانس مکرر، پس تعقیبی بونفرونی و تی مستقل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطوح کلسترول تام و تری‌گلیسرید در هر سه گروه تجربی کاهش معنی‌داری در مقایسه با قبل از دوره مداخله دارد ($P=0/032$). به علاوه، میزان تغییرات کلسترول LDL و HDL به ترتیب $22/75\%$ - کاهش و $49/76\%$ + افزایش تنها در گروه تمرین هوازی همراه با عصاره شوید در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P=0/001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که ترکیب تمرینات منظم هوازی و مکمل‌یاری شوید به دلیل دارا بودن اثرات تجمعی نسبت به درمان با مصرف مکمل شوید و تمرین هوازی به تنهایی، روش درمانی مؤثرتری جهت بهبود شاخص‌های لیپیدی در ارتباط با هایپرلیپیدمی باشد.

کلید واژه‌ها: شوید، تمرین هوازی، هیپرلیپیدمیا.

نحوه استناد به این مقاله: استاد رحیمی ع، جمالی قراخلو ب، آقانی ا، ضرغامی خامنه ع. تأثیر هشت هفته مکمل‌دهی عصاره آبی-الکلی شوید همراه با تمرینات هوازی بر پروفایل لیپیدی مردان چاق مبتلا به هیپرلیپیدمی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۷-۱۵

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

شوید یا شوید با نام علمی آنتوم گراوئولنس گیاهی یکساله یا دو ساله، علفی و معطر از خانوادهٔ چتریان است (۱). گیاه شوید بومی مناطق مدیترانه‌ای، جنوب غربی آسیا و مشرق زمین بوده، به طوریکه امروزه در اکثر نقاط دنیا کشت می‌شود. در ایران نیز علاوه بر کشت در مناطق مختلف، در تبریز، بجنورد و تفرش به صورت خودرو و نیمه خودرو می‌روید (۱-۳). شوید با دارا بودن ترکیب‌های فلاونوئیدی ازجمله: دیکارون، کورستین، لیمونن، آلفا فلاندرین، ترپنوئیدها، دی‌هیدروکارون، آپول، کومارین، کامپول، وینسین، میریستین و سایر فلاونوئیدها به عنوان منبع غنی از ضد اکسیدان‌ها همواره مطرح بوده است (۱). همچنین عصاره اتانولی این گیاه از دیرباز به دلیل دارا بودن ویژگی ضد التهابی، کاهندهٔ گلوکز و چربی خون و از همه مهمتر عدم عوارض جانبی ناشی از مصرف مورد توجه متخصصان بالینی و حتی سایر اقشار جامعه قرار گرفته است (۴،۵). چنانچه نتایج کارآزمایی‌های بالینی به خوبی بیانگر کاهش سطوح کلسترول تام (CT)، تری‌گلیسرید (TG) و لیپوپروتئین با چگالی پائین (LDL) به عنوان عوامل خطر عمدهٔ دخیل در پیشرفت بیماری عروق کرونری (CHD) و آترواسکلوئوزیس متعاقب مصرف این گیاه دارویی است (۲،۳). در این راستا، Yousofvand و همکاران به دنبال تجویز ۳۰ روزهٔ عصارهٔ آبی-الکلی شوید با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در قالب آب نوشیدنی نشان دهندهٔ کاهش معنی‌دار کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و همچنین افزایش معنی‌دار HDL در موش‌های نر بودند (۴). همچنین، Abbasi و همکاران اثرات مصرف یک ماه مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در وزن بدن عصارهٔ هیدروالکلی آنتوم گراوئولنس و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم قرص شوید را در همسترهای نر سوری تغذیه شده با رژیم غذایی کلسترول بالا بررسی و عنوان کردند که نیم‌رخ چربی، گلوکز خون و آنزیم‌های کبدی به طور معنی‌داری به دنبال مصرف عصاره و قرص شوید کاهش می‌یابد (۶). از سویی دیگر، برنامهٔ آموزش ملی کلسترول (NCEP) جهت درمان افراد بالغ برای دههٔ گذشته مداخلات غیردارویی را به عنوان درمان اولیه در بیماران هیپرلیپیدمی توصیه نموده است (۷). به طوریکه، امروزه آثار مثبت تمرینات و فعالیت‌های بدنی برای پیشگیری اولیه و ثانویه بیماری‌های قلبی-عروقی به درستی ثابت شده است. در این رابطه، Ghafari و همکاران بیان نمودند که متعاقب انجام هشت هفته برنامهٔ تمرینی شامل فعالیت‌های هوازی با شدت ۶۵-۷۵٪ ضربان قلب بیشینه باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های التهابی پیشگویی‌کنندهٔ آترواسکلوئوزی و نیم‌رخ‌های لیپیدی همچون هوموسیستئین، تری‌گلیسرید و کلسترول LDL در زنان چاق مبتلا به هایپرلیپیدمی می‌گردد (۷). با وجود این، نتایج قطعی در این زمینه وجود ندارد. به طوری که نتایج مطالعهٔ گروه Talebi-Garakani نشان داد که

چهار هفته تمرین مقاومتی اثر معنی‌داری بر غلظت ApoA-1 و ApoB سرم که به ترتیب آپولیپوپروتئین‌های اصلی کلسترول-HDL و کلسترول-LDL هستند تأثیری نداشته و منجر به کاهش نیم‌رخ چربی موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین (STZ) نیز نمی‌گردد (۸). همچنین Mokhtari و همکاران گزارش کردند که ۱۲ هفته پیاده‌روی پیش‌رونده با شدت ۷۰-۶۰٪ حداکثر ضربان قلب بیشینه اثر معنی‌داری بر بهبود نیم‌رخ چربی زنان مبتلا به دیابت نوع ۲ ندارد (۹). لذا، با توجه به مطالعات محدود و متناقض و عدم دسترسی به یک مطالعهٔ جامع در رابطه با اثرات همزمان مصرف عصارهٔ شوید و فعالیت‌های منظم هوازی بر شاخص‌های لیپیدی، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر هشت هفته مکمل‌یاری قطرهٔ عصارهٔ شوید همراه با تمرین هوازی در مردان مبتلا به هایپرلیپیدمی انجام شد.

روش کار

تحقیق حاضر از نوع کارآزمایی‌های بالینی مداخله‌ای نیمه تجربی با طرح پیش و پس آزمون است که با استفاده از چهار گروه (سه گروه تجربی و شاهد) به صورت دوسویه کور، پس از اخذ کد اخلاق در پژوهش شمالغرب به شمارهٔ مرجع ۴/۵/۴۹۴۹ از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و ثبت در مرکز کار آزمایی بالینی ایران (کد ثبت: IRCT2014100419397N1) در سالن تربیت بدنی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در طی دو ماه دسترسی (فصل پاییز) اجرا گردید. حجم نمونه براساس مطالعات قبلی، در سطح معنی‌داری (آلفا یا خطای نوع اول) ۰/۰۵ درصد و توان (بتا یا خطای نوع دوم) ۰/۸ با استفاده از نرم‌افزار Medcalc نسخهٔ ۱۰.۰.۲۰ با استفاده از روش نمونه‌گیری انتخابی در دسترس و هدفدار انتخاب و برای هر گروه ۱۵ نفر و در مجموع ۶۰ نفر از میان بیماران مرد مبتلا به هایپرلیپیدمی تعیین گردید. در ابتدا، اطلاعات اولیه بیماران بصورت مشخصات دموگرافیک ثبت شد. در یک جلسه توجیهی برای بررسی بیشتر و انتخاب نمونه‌های بهتر، پرسشنامه‌های تعیین سلامتی و یادآمد ۲۴ ساعته رژیم غذایی آزمودنی‌ها که بصورت مصاحبه‌ای بود، توسط مجری و همکاران طرح پر شد. پس از جمع‌آوری و بررسی دقیق پرسشنامه‌های تکمیل شده، با توجه به برخی معیارهای ورود (بیماران هیپرلیپیدمی که دارای سطوح کلسترول و تری‌گلیسرید بین ۲۰۰-۳۰۰ mg/dl محدودهٔ سنی ۲۰ تا ۵۰ سال، شاخص تودهٔ بدنی (BMI) بین ۳۴/۹-۳۰ کیلوگرم بر مجذور متر [چاقی درجه I]، عدم استفاده از داروهای خارج از تجویز پزشک و سایر مکمل‌های کاهندهٔ چربی خون، نداشتن فعالیت بدنی منظم در طی ۶ ماهه گذشته و کسب رضایت آگاهانه در تحقیق) و معیارهای عدم ورود (داشتن مشکلات سیستمیک از

پژوهشگر کنترل شد. در آخر نیز ۵ دقیقه سرد کردن به صورت حرکات کششی و نرمشی انجام شد.

ضربان قلب استراحتی + ((ضربان قلب استراحتی - ضربان قلب بیشینه) × ۷۰٪)
درصد ضربان قلب کاررونین

گروه عصاره شویید (قطره دیل سان)، با مقدار روزانه ۲ میلی گرم در کیلوگرم از وزن بدن را در سه وعده مصرف نمودند. قطره خوراکی شویید از شرکت باریج اسانس کاشان- ایران با مجوز بهداشتی (۱۲۲۸۰۱۴۶۶۶ IRC) از اداره کل نظارت بر مواد غذایی وزارت بهداشت تهیه گردید (۱۱). سپس هر یک آزمودنی ها بدون اطلاع از محتوای قطره (مطالعه دو سویه کور) تهیه شده (گروه مکمل: ۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره شویید) را به مدت هشت هفته مصرف نمودند. نمونه های خونی در دو مرحله (مرحله اول: ۴۸ ساعت پیش از مصرف مکمل و پروتکل تمرینی؛ و مرحله دوم: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و هشت هفته مصرف مکمل) به میزان ۵ میلی لیتر از ورید پیش آرنجی بازوی چپ آزمودنی ها تهیه شد. خون اخذ شده بدون افزودن ماده ضد انعقاد برای تهیه سرم و تعیین شاخص های اکسایشی و التهابی مورد استفاده قرار گرفتند. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط آزمایشگاهی ۲۵-۲۲ قرار داده شدند تا لخته شوند. پس از آن سرم نمونه ها توسط دستگاه سانتریفیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. برای انجام مراحل بعدی، نمونه ها در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس مقادیر شاخص های خونی و پلاسمایی پس از انجام قرارداد تمرینی به صورت اصلاح شده و با در نظر گرفتن درصد تغییرات حجم خون و پلازما محاسبه شد. شاخص های پروفایل لیپیدی سرمی نظیر کلسترول، تری گلیسیرید و HDL-C با استفاده از روش فتومتریک و توسط کیت شرکت پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت. به علاوه، کلسترول-LDL نیز با استفاده از معادله فریدوالد اندازه گیری شد (۲). میزان شاخص همه اندازه گیری ها در ساعت ۱۲-۹ صبح، دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۵-۵۰ درصد، تهویه و نور محیطی یکسان انجام گردید. به علاوه، آزمودنی ها ۴۸ ساعت قبل از انجام آزمون، ضمن حفظ رژیم غذایی معمولی از مصرف هرگونه مکمل غذایی اثر گذار بر آسیب و التهاب، خودداری کردند. همچنین از انجام هر گونه فعالیت ورزشی شدید و استفاده از هرگونه فعالیت (مانند ماساژ، سونا، داروهای ضد التهاب...) که بر آسیب و التهاب سلولی اثر بگذارد اجتناب نمودند. تمامی داده ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (Mean $\pm$ SD) بیان شدند و برای تعیین نرمال بودن توزیع داده های اولیه از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (K-S) استفاده گردید. سپس میانگین تغییرات هر یک از متغیرها طی مراحل دوگانه اندازه گیری و تأثیر متقابل گروه ها (مکمل و دارونما)

جمله محدودیت حرکتی، بیماری های قلبی عروقی حاد، بیماری های ریوی و سایر مشکلات جسمانی که برای آزمودنی خطر ساز شود، عدم رعایت پروتکل مطالعه و استعمال دخانیات و مصرف مشروبات الکلی، ۶۰ نفر مرد چاق به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند. در ادامه، جهت اندازه گیری مقدار کالری مصرفی و کنترل رژیم غذایی با استفاده از نرم افزار تجزیه و تحلیل Food Processor (۲۰۱۱) انجام شد. همچنین، از آزمودنی ها خواسته شد در طول طرح عادات غذایی و فعالیت بدنی خود را ثابت نگه دارند. بیماران که شرایط ورود را داشتند، به صورت تخصیص تصادفی ساده به چهار گروه: کنترل (۱۵ نفر)، تمرین هوازی منظم (۱۵ نفر)، عصاره شویید (۱۵ نفر) و تمرین هوازی منظم همراه با عصاره شویید (۱۵ نفر) تقسیم شدند. لازم به ذکر است که در ادامه پروتکل، یک نفر از گروه کنترل، دو نفر از هر یک از گروه های عصاره شویید و تمرین هوازی منظم همراه با عصاره شویید و سه نفر از گروه تمرین هوازی منظم حاضر به ادامه همکاری نشدند. برای اندازه گیری درصد چربی از کالیپر (هارپندن، مدل ۰۱۲۰، انگلیس) با حساسیت ۰/۱ میلی متر و فرمول سه نقطه ای دانشکده پزشکی ورزشی آمریکا (ACSMs) (چین های پوستی سه سربازویی، شکمی و فوق خاصره ای سمت راست) استفاده شد (۹).

$$5/18145 - [(سن) \times 0/15772] + 2 \times (\text{مجموع سه قسمت}) \times 0/00105 - \\ (\text{مجموع سه قسمت}) \times (0/39217) = \text{درصد چربی}$$

قرارداد ورزشی شامل شرکت افراد در یک برنامه تمرینی هشت هفته ای (مشمول بر ۳ جلسه تمرین در هفته و در کل ۲۴ جلسه تمرین) دویدن روی نوارگردان (به مدت ۴۵ دقیقه با شدت ۷۰-۶۰٪ ضربان قلب ذخیره و شیب صفر درجه) بود. ضربان قلب پایه هر یک از آزمودنی ها پس از ۱۰ دقیقه استراحت (به حالت نشسته) با ضربان سنج پولار ثبت شد. در حالی که ضربان قلب بیشینه آزمودنی ها، با استفاده از فرمول کاروونن یا همان ضربان قلب ذخیره که درصد آن برابر با درصدی از اکسیژن مصرفی بیشینه (توان هوازی) استفاده گردید (۷). آزمودنی ها قبل از اجرای قرارداد ورزشی، به منظور گرم کردن، ۱۰ دقیقه حرکات کششی انجام دادند و سپس سه دقیقه روی نوارگردان با شیب صفر درجه دویدند (تا رسیدن به ضربان قلب ۱۲۰ ضربه در دقیقه). پس از این مرحله، سرعت نوارگردان به منظور دستیابی به ضربان قلب هدف تحقیق یعنی ۶۰ الی ۷۰ درصد ضربان قلب ذخیره طی مدت دو دقیقه افزایش پیدا کرد (۷۸). سپس، هر یک از آزمودنی ها با نزدیک شدن به شدت ۶۰ درصد ضربان قلب ذخیره به مدت ۳۰ دقیقه (فعالیت اصلی) روی نوارگردان دویدند. در ادامه نیز ضربان قلب آزمودنی ها و سرعت نوارگردان تا پایان قرارداد ورزشی توسط

و مراحل خون‌گیری، از آزمون‌های تحلیل واریانس (ANOVA) با اندازه‌گیری مکرر 2×4 (گروه $\times$ مراحل) استفاده شد. در صورت مشاهده اختلاف بین مراحل زمانی، از آزمون تعقیبی بونفرونی و برای تعیین اختلاف درون گروهی از آزمون t وابسته استفاده شد. تمامی عملیات‌ها و تحلیل‌های آماری در سطح معنی‌داری پنج درصد ($\alpha \leq 0.05$) با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS 22 و Excel 2010 انجام شد. به علاوه، سهم اثر هر یک از عوامل مداخله‌گر با استفاده از مجذور امگا (ω^2) تعیین گردید.

یافته‌ها

میانگین و انحراف استاندارد ویژگی‌های دموگرافیک (سن، وزن، قد، درصد چربی، شاخص توده بدنی و میزان کالری مصرفی ۲۴ ساعته) گروه‌های مورد مطالعه به تفکیک در جدول ۱ نشان داده شده است. اطلاعات این جدول نشان می‌دهد که تفاوت آماری معنی‌داری در مقادیر ویژگی‌های فردی به غیر از درصد چربی بدن ($P=0.03$) در مرحله پس از مطالعه بین گروه‌های مورد مطالعه وجود ندارد ($P \geq 0.05$). لذا گروه‌ها با یکدیگر همگن بودند (جدول ۱). با این حال، نتایج آزمون آماری نشان داد که تمامی شاخص‌های تن‌سنجی (جدول ۱) در پس از آزمون نسبت به مقادیر پایه در گروه‌های مداخله کاهش نشان داد؛ اما تنها در درصد چربی بدن و آن هم در دو گروه تمرین هوازی و گروه تمرین هوازی همراه با عصاره شویید به ترتیب $4/5\%$ و $7/5\%$ کاهش معنی‌دار در مقایسه با قبل از مداخله داشت. آزمون تعقیبی

بونفرونی نشان داد تغییرات درصد چربی بدن در گروه‌های تمرین هوازی و تمرین هوازی همراه با عصاره شویید نسبت به گروه شاهد معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$)؛ اما نسبت به گروه عصاره شویید معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0.05$). همچنین تغییرات در انرژی دریافتی، وزن و شاخص توده بدن در هیچ یک از گروه‌ها نسبت به هم معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). نتایج تحلیل واریانس مکرر (ANOVA) شاخص‌های لیپیدی مردان مبتلا به هیپرلیپیدمی حاکی از آن است که اثر تقابلی معنی‌داری بین گروهی وجود دارد (جدول ۲). چنانکه، سطوح کلسترول تام و تری‌گلیسیرید در تمامی گروه‌ها و سطح LDL-C سرم تنها در گروه ترکیبی (تمرین هوازی+عصاره شویید) در بعد از مداخله بطور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P=0.001$). همچنین سطح HDL-C در حدود $7/9\%$ ، $22/13\%$ و $49/76\%$ به ترتیب در گروه‌های مکمل، تمرین هوازی و مکمل+تمرین هوازی نسبت به قبل از مداخله افزایش نشان داشت که این افزایش تنها در گروه ترکیبی یعنی مکمل+تمرین هوازی از نظر آماری معنی‌دار بود ($F=12/75$, $P=0.003$) (جدول ۲). در ضمن، آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که تغییرات سطح کلسترول تام و تری‌گلیسیرید در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد معنی‌دار می‌باشد. تغییرات سطح LDL-C در گروه‌های تمرین هوازی و تمرین هوازی+عصاره شویید نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P=0.032$) (جدول ۲).

جدول ۱: ویژگی‌های تن‌سنجی و فیزیولوژیک آزمودنی‌های پژوهش

متغیرها	گروه‌ها تعداد	گروه شاهد ۱۵ نفر	گروه عصاره شویید ۱۳ نفر	گروه تمرین ۱۳ نفر	گروه عصاره شویید+تمرین ۱۲ نفر	P بین گروهی
سن (سال)	پیش آزمون پس آزمون	۳۵/۸±۱۰/۹	۳۷/۸±۱۲/۱	۳۷/۹±۱۰/۶	۳۹/۷±۱۱/۲	۰/۷۶
قد (سانتی‌متر)	پیش آزمون پس آزمون	۱۷۸/۸۹±۶/۲۹	۱۷۵/۰۹±۲/۳۴	۱۷۴/۲۵±۳/۴۷	۱۷۷/۰۲±۱/۶۹	۰/۰۹
وزن (کیلوگرم)	پیش آزمون پس آزمون	۹۴/۸±۹/۱	۹۳/۸±۱۱/۵	۹۷/۲±۸/۳	۹۵/۲±۹/۳	۰/۶۸
شاخص توده بدن (کیلوگرم/مترمربع)	پیش آزمون پس آزمون	۹۵/۳±۸/۶	۹۴/۰۵±۱۰/۴	۹۶/۸±۸/۱	۹۴/۷±۸/۶	۰/۶۱
درصد چربی بدن (درصد)	P درون گروهی پیش آزمون پس آزمون	۰/۶۳ ۳۴/۱۸±۱/۹۲ ۳۴/۸±۲/۰۲	۰/۰۷ ۳۲/۳۲±۲/۲۲ ۳۲/۱۲±۲/۵۲	۰/۱۵ ۳۳/۱۵±۲/۸۸ ۳۲/۸۵±۳/۳۱	۰/۰۹ ۳۳/۱۵±۲/۵۸ ۳۲/۷۵±۲/۲۵	۰/۹۶
انرژی دریافتی (کیلوکالری/روز)	P درون گروهی پیش آزمون پس آزمون	۰/۶۱ ۲۵۲۵/۳±۱۱۵ ۲۶۱۴/۵±۱۲۷	۰/۱۱ ۲۵۵۰/۶±۲۱۰ ۲۴۸۸/۵±۱۸۹	۰/۱۵ ۲۶۱۰/۵±۱۶۷ ۲۵۰۳/۳±۱۵۶	۰/۰۸ ۲۵۷۵/۲±۱۸۵ ۲۴۳۶/۷±۱۳۶	۰/۸۷
درصد چربی بدن (درصد)	P درون گروهی پیش آزمون پس آزمون	۰/۳۷ ۳۸/۵۲±۲/۱۲ ۳۸/۸۵±۱/۹۱	۰/۶۱ ۳۹/۱۲±۱/۳۵ ۳۸/۹۱±۲/۲۲	۰/۵۶ ۳۹/۱±۲/۲۵ ۳۷/۳۵±۱/۸۵	۰/۴۴ ۳۹/۱۸±۱/۳۳ ۳۶/۲۱±۱/۲۱	۰/۷۹
	P درون گروهی	۰/۵۳	۰/۱۱	۰/۰۰۳#†	۰/۰۰۱†#	۰/۰۳۴

مقادیر به شکل انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده است.

‡ آزمون تی مستقل

آزمون تی همبسته

† معنی‌داری نسبت به گروه شاهد؛ همگی در سطح معنی‌داری پنج درصد ($P \leq 0.05$)

جدول ۲: مقایسه میانگین و انحراف استاندارد شاخص‌های پروفایل لیپیدی، پیش و پس از اعمال مداخلات در گروه‌های مختلف پژوهش

متغیرها	گروه‌ها	مراحل تمرین			تغییرات	P درون گروهی	P بین گروهی
		پیش آزمون	پس آزمون	پس آزمون			
Cholesterol (mg/dl)	شاهد	۲۴۵/۶۱±۴۲/۷۱	۲۴۷/۴۱±۳۹/۲۵	۲/۲۱±۰/۸۹	۰/۲۱۵	۰/۰۰۱§	
	عصاره شوید	۲۴۰/۳۵±۳۸/۰۴	۱۹۸/۳۵±۲۸/۰۳	-۴۲/۱±۱۷/۱۵	۰/۰۱۴‡		
	تمرین هوازی	۲۴۲/۷۲±۴۷/۷۹	۲۰۱/۴۹±۲۱/۸۵	-۴۱/۲۵±۲۸/۲۱	۰/۰۱۶‡		
	تمرین هوازی+عصاره شوید	۲۴۹/۵۳±۳۹/۷۸	۱۸۹/۴۱±۳۸/۰۷	-۵۱/۱۲±۱۳/۱۵	۰/۰۰۳‡		
TG (mg/dl)	شاهد	۲۲۲/۳۲±۵۰/۶۲	۲۲۹/۸۶±۴۴/۶۷	۷/۲۲±۵/۹۱	۰/۱۸۹	۰/۰۰۱§	
	عصاره شوید	۲۱۷/۷۲±۴۸/۱۱	۱۷۶/۷۲±۴۴/۳۹	-۴۱/۰۹±۱۲/۱۱	۰/۰۱۷‡		
	تمرین هوازی	۲۳۷/۲۱±۳۳/۸۵	۱۸۳/۸۳±۵۱/۳۲	-۵۴/۴۵±۲۶/۱۲	۰/۰۰۳‡		
	تمرین هوازی+عصاره شوید	۲۲۵/۷۴±۴۸/۰۳	۱۵۳/۳۷±۴۶/۲۷	-۷۲/۳۶±۹/۵۱	۰/۰۰۱‡		
HDL-C (mg/dl)	شاهد	۵۰/۶۲±۹/۷۱	۴۹/۶۷±۹/۲۲	-۱/۰۳±۰/۶۱	۰/۱۱۴	۰/۰۰۳§	
	عصاره شوید	۴۸/۲۶±۹/۴۴	۵۲/۲۶±۹/۰۴	۴/۱±۱/۰۲	۰/۱۲۲		
	تمرین هوازی	۴۵/۷۳±۱۱/۷۹	۵۸/۷۳±۷/۹۱	۱۳/۱±۴/۱۵	۰/۰۶۱		
	تمرین هوازی+عصاره شوید	۴۶/۴۲±۱۰/۷۸	۶۹/۵۲±۹/۰۸	۲۳/۱۶±۱/۳۹	۰/۰۰۱‡		
LDL-C (mg/dl)	شاهد	۱۲۵/۰۲±۲۱/۷۱	۱۳۱/۰۲±۲۰/۰۱	۶/۰۱±۲/۱۶	۰/۱۲۵	۰/۰۱۴§	
	عصاره شوید	۱۲۴/۲۶±۱۹/۴۴	۱۱۵/۲۶±۲۳/۰۴	-۹/۲۱±۴/۳۹	۰/۰۸۷		
	تمرین هوازی	۱۲۴/۷۳±۲۲/۷۹	۱۱۳/۲۳±۲۷/۶۱	-۱۱/۴۹±۵/۱۹	۰/۰۸۹		
	تمرین هوازی+عصاره شوید	۱۲۳/۴۹±۲۹/۸۳	۹۵/۵۲±۱۹/۷۸	-۲۸/۱±۱۰/۱۲	۰/۰۰۱‡		

‡ معنی داری درون گروهی در سطح (P<۰/۰۵). § معنی داری بین گروهی در سطح (P<۰/۰۵).

بحث

۳۲ خرگوش نر نیوزلندی تحت رژیم با کلسترول بالا (۱٪ رژیم غذایی) گزارش کردند که کاهش معنی‌دار سه ساعته در سطوح شاخص‌های خطر قلبی-عروقی همچون؛ LDL، کلسترول تام و آنزیم‌های کبدی بین دو گروه مداخله دارویی معنی‌دار نبود (۱۴). در تحقیقی دوسویه‌کور کنترل شده با دارونما، گروه مطالعاتی Mobasseri و همکاران با بررسی ۸ هفته مصرف پودر آنتوم (۳/۳ گرم در روز) توسط ۶۰ بیمار دیابتی نشان دهنده عدم اثر معنی‌دار بر بهبود تری‌گلیسرید و کاهش جالب توجه ۵/۷٪ در کلسترول HDL در بیماران دیابتی نوع ۲ بودند (۱۳). این در حالی بود که سطوح کلسترول خوب (HDL) در مطالعه حاضر با افزایش غیرمعنی‌دار ۷/۱۲٪ مواجه بود. وجود تناقضات در مطالعات فوق‌الذکر ممکن است ناشی از عوامل اثرگذار و مداخله‌گری مانند سن، جنس، تفاوت‌های فردی، آمادگی بدنی، نوع فعالیت بدنی و طول مدت مکمل‌دهی باشد. چنانکه، طول دوره مصرف مکمل (سه ساعته) در مطالعه سترکی به نظر نمی‌رسد برای اعمال اثرات ضدلیپیدمی مکمل شویید کافی باشد. با این حال چنین عنوان شده است که استفاده از داروهای کاهنده چربی خون همچون شویید دارای ویژگی مهارکنندگی رقابتی با آنزیم HMG-CoA ردوکتاز (آنزیم کاتالیز کننده HMG-CoA به موالونات) هستند (۶). این آنزیم در مسیر سوخت و ساز موالونات آنزیم تعیین‌کننده سرعت واکنش‌ها است، یعنی مهار یا تسریع آن موجب کاهش یا افزایش بیوستز کلسترول می‌شود (۶). در تأیید این فرضیه، Abbasi و

یافته‌های پژوهش حاضر مبنی بر کاهش معنی‌دار سطوح سرمی نیم‌رخ‌های چربی (کلسترول و تری‌گلیسرید) متعاقب هشت هفته مکمل یاری شویید و تمرینات هوازی در مردان مبتلا به هایپرلیپیدمی با نتایج تحقیق Yousofvand و همکاران و Salih و Sahib و همکاران هم‌خوانی دارد (۴، ۱۲). به عنوان نمونه، Yousofvand و همکاران متعاقب تجویز ۳۰ روزه عصاره آبی-الکلی شویید با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در قالب محلول نوشیدنی نشان دهنده کاهش معنی‌دار میزان کلسترول و تری‌گلیسرید در موش‌های نر بودند (۴). همچنین، نتایج مطالعه Salih و Sahib به دنبال یک کارآزمایی بالینی تصادفی آینده‌نگر نشان داد که چهار هفته مصرف کپسول‌های ۵۰۰ میلی‌گرمی حاوی پودر خام تخم شویید (دوبار در روز) منجر به کاهش معنی‌دار نیم‌رخ چربی (کلسترول و تری‌گلیسرید) و تعدیل در شاخص آترواسکلویتیک بیماران هایپرلیپیدمیک می‌شود (۱۲). شایان ذکر است که سایر شاخص‌های لیپیدی مورد مطالعه در این تحقیق (کلسترول LDL و HDL) نیز در مقایسه با حالت پایه تغییر داشتند، اگرچه این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در حمایت از این یافته‌ها، Mobasseri و همکاران و Setorki و همکاران اظهار داشتند که مصرف شویید اثر قابل توجهی بر روی شاخص‌های لیپیدی ندارد (۱۳، ۱۴). چنانکه، Setorki و همکاران با مقایسه اثرات عصاره هیدروالکلی شویید (۲۰۰ میلی‌گرم در وزن بدن) و لواستاتین (۱۰ میلی‌گرم در وزن بدن) بر پروفایل لیپیدی

همکاران اثرات مصرف یک ماه مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در وزن بدن عصاره هیدروالکلی آنتوم گراونولنس و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم قرص شوید را در همسترهای نر سوری تغذیه شده با رژیم غذایی کلسترول بالا را بررسی و عنوان کردند که، نیم‌رخ چربی، گلوکز خون و آنزیم‌های کبدی بطور معنی‌داری به دنبال مصرف عصاره و قرص شوید کاهش می‌یابد (۶). به علاوه، تغییر در سطح بیان ژن mRNA آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل‌گلوکوتاریل-کوآنزیم A (HMG-CoA) ردوکتاز به دنبال ارزیابی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و میزان فعالیت آن توسط روش اسپکتروفتومتری، به طور قابل توجهی در حیوانات دریافت‌کننده ۲۰۰ میلی‌گرم در وزن بدن شوید کاهش داشت (۵،۱۲). محققان چنین بیان می‌کنند که اثر هیپولیپیدمیک عصاره شوید ناشی از ترکیبات فلاونوئیدی موجود در آن یعنی کوئرستین میانجیگری می‌شود. ثابت شده است که کوئرستین و ایزورامنتین می‌توانند سطح تری‌گلیسرید تام را پائین بیاورند. بخشی از این اثرات کاهنده کوئرستین ناشی از کاهش تولید ApoB-100 توسط کبد است. کاهش تولید ApoB-100 منجر به کاهش VLDL و در نتیجه تری‌گلیسرید تام خواهد شد (۵-۲). همچنین، Yazdanparast و همکاران پیشنهاد کردند که برخی ترکیبات موجود در آنتوم همانند کاروتن، لیمونن یا آلفا-فلاندرین مسئول ویژگی‌های هیپولیپیدمیک آنتوم هستند و به احتمال زیاد از طریق کاهش فعالیت آسیل‌کوآکربوکسیلاز (ACC) یا HMG-CoA ردوکتاز به عنوان آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم اسیدچرب و کلسترول، اعمال ضدلیپیدمیک خود را اعمال می‌کنند (۱۵). اخیراً نیز Takahashi و همکاران مطابق تجویز رژیم غذایی با چربی بالا گزارش کردند که مصرف چهار هفته مکمل عصاره دانه شوید منجر به کاهش تری‌گلیسرید پلاسمایی، سطوح گلوکز خون و افزایش در بیان سطوح mRNA ژن گیرنده آلفای فعال شده توسط تکثیردهنده‌های پراکسی‌زوم (PPAR- α) می‌شود (۱۶). در حال حاضر به خوبی ثابت شده است که PPAR- α با افزایش در فعال‌سازی میزان بیان mRNA ژن‌های وابسته به اکسایش اسیدهای چرب در هپاتوسیت‌ها، منجر به سرکوب تجمع لیپیدهای کبدی و کاهش سطوح چربی‌های در گردش می‌شود (۱۶). همچنین، نتایج تحقیق حاضر حاکی است که ترکیب مکمل‌دهی شوید همراه با فعالیت منظم هوازی دارای اثرات تجمعی بمراتب بیشتری در کاهش شاخص‌های نامطلوب لیپیدی در مقایسه با مصرف شوید به تنهایی و انجام فعالیت هوازی به تنهایی است. در این راستا، یافته‌های مطالعات Askari و همکاران و Rashid Lamir و همکاران بر اثرات مظاعف مکمل‌دهی در تعامل با فعالیت‌های بدنی بر نیم‌رخ‌های لیپیدی دلالت دارد (۲،۱۷). به عنوان نمونه، Askari و همکاران با بررسی عصاره آبی-الکلی شوید همراه با تمرین شنا بر نیم‌رخ‌های چربی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت گزارش

کردند که مصرف روزانه شوید به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت شش هفته اثر معنی‌داری بر کاهش سطوح HDL، LDL، VLDL، TG و کلسترول تام و افزایش سطوح HDL موش‌های صحرایی دیابتی دارد. تمرین شنا به همراه مصرف عصاره نسبت به مصرف عصاره به تنهایی، اثر بیشتری بر کاهش LDL و کلسترول تام داشت. به علاوه، تأثیر تمرین شنا به همراه مصرف عصاره نسبت به مصرف عصاره به تنهایی و تمرین شنا بر افزایش HDL بیشتر بود (۲). Rashid Lamir و همکاران اظهار داشتند که مصرف روزانه ۹۰۰ میلی‌گرم آنتوم گراونولنس همراه با سه جلسه ۵۵ دقیقه‌ای تمرین هوازی با شدت ۷۵-۶۰٪ حداکثر ضربان قلب (HRmax) به مدت چهار هفته، اثر معنی‌داری بر کاهش کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL، VLDL، گلوکز ناشتا و شاخص توده بدن و همچنین افزایش HDL زنان مبتلا به دیابت نوع ۲ دارد (۱۷). همچنین، Ketabi Poor و همکاران به دنبال طرحی نیمه‌تجربی در ۲۹ زن یائسه غیرورزشکار چاق گزارش نمودند که هشت هفته تمرین هوازی در آب (سه جلسه در هفته و هر جلسه با شدت فزاینده ۵۰ تا ۷۰ درصد ضربان قلب بیشینه به مدت ۴۵ دقیقه) موجب کاهش برخی عوامل خطرزای قلبی-عروقی به ویژه کاهش در آپوپروتئین B، ApoB/ApoA، LDL، VLDL و افزایش میزان ApoA می‌گردد (۱۸). از سوی دیگر، گروه مطالعاتی Talebi-Garakani در تناقض با نتایج پژوهش حاضر عنوان نمودند که ۴ هفته تمرین مقاومتی اثر معنی‌داری بر غلظت ApoA-I و ApoB سرم که به ترتیب آپولیپوپروتئین‌های اصلی کلسترول-HDL و کلسترول-LDL ندارد و منجر به کاهش نیم‌رخ چربی موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین نیز نمی‌گردد (۸). همچنین، Mokhtari و همکاران گزارش کردند که ۱۲ هفته پیاده‌روی پیش‌رونده با شدت ۷۰-۶۰٪ حداکثر ضربان قلب بیشینه اثر معنی‌داری بر بهبود نیم‌رخ چربی زنان مبتلا به دیابت نوع ۲ ندارد (۹). به هر حال، در رابطه با اثر فعالیت‌های ورزشی بر نیم‌رخ‌های چربی می‌توان اینگونه بیان نمود که HDL یک نقش بسیار مهم را در مسیر حمل و نقل کلسترول ایفا می‌کند و میزان آن با توجه به حجم و شدت تمرین افزایش می‌یابد (۹). همچنین در چندین گزارش موجود افزایش HDL پلاسما با کاهش وزن و تری‌گلیسرید پلاسما بدن مرتبط بوده که در ظاهر این تغییرات باعث بهبود حساسیت به انسولین نیز می‌شود. یکی از علت‌های احتمالی افزایش HDL، افزایش فعالیت آنزیم لیپوپروتئین‌لیپاز (LPL) در نتیجه فعالیت ورزشی است. آنزیم LPL در تبدیل VLDL به HDL مؤثر بوده و با افزایش فعالیت آن، سطح HDL نیز افزایش می‌یابد. از طرفی، لسیتین-کلسترول آسیل ترانسفراز (LCAT) آنزیم مسئول انتقال استر به کلسترول HDL می‌باشد (۸،۹). در صورتی‌که نشان داده شده است که LCAT متعاقب تمرینات ورزشی افزایش یافته و منجر به افزایش آنزیم

بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از ریاست مرکز تحقیقات علوم تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز و افراد شرکت کننده در تحقیق اعلام می‌دارند.

ملاحظات اخلاقی: مقاله حاضر دارای کد اخلاق در پژوهش از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد.
منافع متقابل: مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

منابع مالی: حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی از سوی مرکز تحقیقات علوم تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت پذیرفته است.
مشارکت مؤلفان: استاد رحیمی ع، طراحی و تحلیل نتایج مطالعه و همچنین جمالی ب، اجرا و تالیف مقاله را بر عهده داشت. آمقانی آ، مسئول ثبت نام و تخصیص تصادفی و مکلف نموده آزمودنی‌ها به شرکت در مداخله بود. تمام همکاران نسخه نهایی را مطالعه و مورد تأیید قرار داده‌اند.

LPL می‌شود. با این حال چنین پیشنهاد شده است که برای افزایش سطوح کلسترول HDL همراه با افزایش در فعالیت LPL به هزینه انرژی برابر با ۱۱۰۰ کیلوکالری نیاز است (۱۷).

نتیجه‌گیری

به هر حال، باتوجه به یافته‌های مطالعه انجام شده چنین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً مصرف هشت هفته مکمل شوید همراه با تمرینات منظم هوازی (با دارا بودن ویژگی ضدلیپیدمیک در مردان مبتلا به هایپرلیپیدمی) بتواند از تغییرات نامطلوب شاخص‌های مربوط به خطر قلبی-عروقی جلوگیری کند. از اینرو، با در نظر گرفتن جوانب احتیاط می‌توان به افراد بیمار در معرض خطر و حتی افراد فعال پیشنهاد کرد که به منظور جلوگیری و کاهش بیماری‌های قلبی-عروقی از مکمل عصاره گیاه شوید در کنار فعالیت‌های منظم هوازی استفاده نمایند.

قدردانی

مقاله حاضر بخشی از یافته‌های طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد. نویسندگان

References

1. Al-Snafi A. The pharmacological importance of anethum graveolens, A review. *Inte J Pharm* 2014; **6**(4): 20-32. doi:10.1155/2016/1098916
2. Askari M, Nazari H, Rahimizadeh S, Sadeghimansorkhani H, Daneshpayeh N. The Effect of the Hydroalcoholic Extract of Dill (Anethum graveolens) Seed on Lipid Profile in Diabetic Male Rats. *Armaghane Danesh* 2016; **21**(5): 446-454. (Persian).
3. Piri M, Shahin M S, Oryan S. The effects of anethum on plasma lipid and lipoprotein in normal and diabetic rats fed high fat diets. *Shahrekord University Medical Sciences J* 2010; **11**(4): 15-25. (Persian).
4. Yousofvand N, Soltany A. Effects of hydro alcoholic extract of dill (Anethum graveolens) on the serum levels of blood lipids cholesterol, triglycerides, LDL and HDL in male NMRI mice. *J Pharm Chem Biol Sci* 2015; **3**(1): 114-121.
5. Kazemi T, Panahi shahri H, Hossaini farash M, Darabi M, Kashanian M, Akbari H. Effect of Dill pearl on serum lipids. *Arak Medical University J* 2006; **8**(3): 35-41. (Persian).
6. Abbasi Oshaghi E, Khodadadi I, Saidijam M, Yadegarazari R, Shabab N, Tavalani H, et al. Lipid lowering effects of hydroalcoholic extract of Anethum graveolens l. and dill tablet in high cholesterol fed hamsters. *Cholesterol* 2015; **20**(15): 958560. doi:10.1155/2015/958560
7. Ghafari G, Bolboli L, Rajabi A, Saedmochshi S. The effect of 8 weeks aerobic training on predictive inflammatory markers of atherosclerosis and lipid profile in obese elderly women. *SJIMU* 2016; **23**(7): 144-154. (Persian).
8. Talebi-Garakani E, Safarzade A. The effect of resistance training intensity on serum Apoa-i concentration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iranian J Endo Met* 2013; **15**(2): 183-189. (Persian).
9. Mokhtari F, Esfarjani F, Kargar Fard M. The effect of combined aerobic exercise and barley β -glucan on lipid profile and glucose blood of women with diabetes type two. *IJDL* 2014; **13**(4): 340-351.
10. Ehrman J K. ACSM's resource manual for guidelines for exercise testing and prescription. 7th ed. Philadelphia, Wolters kluwer health, lippincott williams & wilkins. USA, 2013; PP: 200-284.
11. Kalantari H, Rezaei M, Salehcheh M, Moosavi M. Determination of the mutagenicity potential of

- dillsun herbal medicine by single cell gel electrophoresis in rat hepatocytes. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2013; **8**(2): 55-59.
12. Salih Sahib A, Hashim Mohammad I, Al-Gareeb A. Effects of Anethum graveolens leave powder on lipid profile in hyperlipidemic patients. *Spatula DD* 2012; **2**(3): 153-158. doi: 10.5455/spatula.20120907123553
13. Mobasser M, Payahoo L, Ostadrahimi A, Bishak Y K, Jafarabadi M A. Anethum graveolens supplementation improves insulin sensitivity and lipid abnormality in type 2 diabetic patients. *Pharm Sci* 2014; **20**(2): 40-45.
14. Setorki M, Shahinfard N, Ansari R, Forouzandeh Z, Asgharzadeh S, Rafieian-Kopaei M. Comparison between the Effects of Hydro alcoholic Extract of Dill and Statins on Lipid Profile. *J Kerman University Medical Sci* 2013; **20**(2): 158-168. (Persian).
15. Yazdanparast R, Bahramikia S. Evaluation of the effect of Anthem graveolens L. Crude extracts on serum lipids and lipoproteins profiles in hypercholesterolaemic rats. *DARU J Pharma Scie* 2008; **16**(2): 88-94. (Persian).
16. Takahashi N, Yao L, Kim M, Sasako H, Aoyagi M, Shono J, et al. Dill seed extract improves abnormalities in lipid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) activation in diabetic obese mice. *Mol Nutr Food Res* 2013; **57**(7): 1295-1299. doi: 10.1002/mnfr.201200767
17. Rashid Lamir A, Gholamian S, Hashemi Javaheri A A, Dastani M. The effect of 4-weeks aerobic training according with the usage of Anethum Graveolens on blood sugar and lipoproteins profile of diabetic women. *Annals Biol Research* 2012; **3**(9): 4313-4319.
18. Ketabi Poor S M, Koushkie Jahromi M. Effect of Aquatic Aerobic Training on Serum A and B Apoproteins and Lipoproteins in Obese and Normal Weight Menopause Women. *Arak Med University J* 2014; **17**(8): 44-52. (Persian).

The effect of eight weeks high intensity intermittent training (HIIT) on the expression of miRNA-1 and miRNA-21 in sedentary adolescent boys

Ramin Amirsasan^{1*}, Mostafa Armanfar¹, Javad Hesari²

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

²Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author; E-mail: amirsasan@tabrizu.ac.ir

Received: 12 July 2017 Accepted: 3 September 2017 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):16-23

Abstract

Background: The microRNA (miRNA) is a new class of biomarkers that are involved in many biological processes and gene expression. The present study examined the effect of eight weeks of high intensity intermittent training (HIIT) on the levels of miRNA-1 and miRNA-21 in adolescent boys.

Methods: In this experimental study, 22 adolescent boys in a randomly were allocated in two equal groups: HIIT group and control group. Training programs were conducted 3-4 times per week for 8 weeks. The HIIT program consisted of 6-8 running sprints (30-60 seconds) with a 3.5-4 min recovery. Mentioned indicators assessments were performed 18-24 hours pre and post intervention.

Results: The miRNA-1 was significantly higher after 8 week HIIT than they were pre-exercise training (pre-HIIT vs. post-HIIT) ($P < 0.05$). However, miRNA-21 was significantly lower after the training period ($P < 0.05$).

Conclusion: The miRNA-1 and miRNA-21 can be used as an indicator to assess the adaptations associated with exercise training.

Keyword: High Intensity Intermittent Training, Mirna-1, Mirna-21, Adolescent Boys.

How to cite this article: Amirsasan R, Armanfar M, Hesari J. [The effect of eight weeks high intensity intermittent training (HIIT) on the expression of miRNA-1 and miRNA-21 in sedentary adolescent boys]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):16-23. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر بیان *miRNA-1* و *miRNA-21* پسران نوجوان غیر فعالرامین امیرساسان^{۱*}، مصطفی آرمان فر^۱، جواد حصاری^۲^۱گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران^۲گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول: ایمیل amirsasan@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۲ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۱۶-۲۳

چکیده

زمینه: microRNA (miRNA) دسته جدیدی از شاخص‌های زیستی هستند که در بسیاری از فرآیندهای زیستی و بیان ژن درگیر هستند. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (High Intensity Intermittent Training, HIIT) بر غلظت *miRNA-1* و *miRNA-21* پسران نوجوان انجام شد.

روش کار: در این مطالعه نیمه تجربی، ۲۲ پسر نوجوان (۱۵-۱۷ ساله) انتخاب و پس از همگن‌سازی بر اساس سن، برخی شاخص‌های پیکرشناختی و میزان آمادگی هوازی به صورت تصادفی در دو گروه کنترل و تمرین جایگزین شدند. سپس، هشت هفته (هر هفته ۳-۴ جلسه) تمرین HIIT را اجرا کردند که هر جلسه تمرین شامل ۸-۶ تکرار دویدن ۶۰-۳۰ ثانیه‌ای با شدت تمام و ۴-۳/۵ دقیقه استراحت بین هر تکرار بود. در نهایت، مقادیر هر یک از شاخص‌های فوق‌الذکر، ۲۴-۱۸ ساعت قبل و بعد از مداخله تمرینی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: پس از هشت هفته تمرین HIIT، غلظت پایه *miRNA-1* نسبت به دوره پیش از تمرین افزایش یافت ($P < 0.05$)، در حالی که غلظت *miRNA-21* کاهش یافت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد استفاده از تغییرات *miRNA-1* و *miRNA-21* ممکن است شاخص مناسبی برای ارزیابی سازگاری‌های مرتبط با تمرینات ورزشی باشد.

کلید واژه‌ها: تمرینات تناوبی شدید، *miRNA-1*، *miRNA-21*، پسران نوجوان.

نحوه استناد به این مقاله: امیرساسان ر، آرمان فر م، حصاری ج. تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر بیان *miRNA-1* و *miRNA-21* پسران نوجوان غیر فعال. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۱۶-۲۳

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

تمرین تناوبی شدید (HIIT) از روش‌های جدید تمرینات ورزشی است که در سال‌های اخیر مورد توجه ورزشکاران، مربیان و پژوهشگران علوم ورزشی قرار گرفته است. اگرچه تعریفی از HIIT (که مورد توافق تمام محققان باشد) وجود ندارد، معمولاً تمرینات HIIT به جلسات تکراری نسبتاً کوتاه و متناوب تمرینی گفته می‌شود که اغلب با حداکثر تلاش و توان بدنی انجام می‌شود و یا در شدتی نزدیک به شدت اکسیژن مصرفی بیشینه (VO_{2max}) انجام می‌شود (یعنی در حدود بیشتر از ۹۰ درصد VO_{2max}) (۱). بسته به شدت فعالیت ورزشی، یک وهله تلاش و فعالیت ممکن است چند ثانیه تا چند دقیقه طول بکشد، که وهله‌های فعالیت با استفاده از چند دقیقه استراحت یا فعالیت با شدت پایین از یکدیگر جدا می‌شوند (۲). HIIT در وهله‌های تکراری کوتاه مدت تا متوسط فعالیت (۱۰ ثانیه تا ۵ دقیقه) با شدتی بالاتر از آستانه بی‌هوازی و لاکتات اجرا می‌شود که با دوره‌های استراحت فعال کم شدت یا غیر فعال از یکدیگر جدا می‌شود تا بازگشت به حالت اولیه نسبی را فراهم سازد. بهینه‌سازی HIIT به بهینه‌کردن شدت، مدت، تعداد وهله‌های تمرینی، به علاوه شکل فعال یا غیر فعال و مدت استراحت بین وهله‌های تمرینی باز می‌گردد. در پژوهش‌های مختلف، تاثیر تمرینات HIIT بر دامنه وسیعی از متغیرهای عملکردی از جمله VO_{2max} (۲)، آستانه بی‌هوازی، آستانه لاکتات (LT)، آستانه تهویه‌ای (VT) و اولین نقطه تجمع لاکتات در خون (OBLA) در مقایسه با سایر اشکال تمرینی مورد ارزیابی قرار گرفته است. برای مثال، در پژوهشی Burgomaster و همکاران (۲۰۰۵)، نشان دادند که شش جلسه تمرین تناوبی سرعتی (آزمون وینگیت ۳۰ ثانیه‌ای با ۴ دقیقه استراحت بین هر وهله آزمون) به مدت دو هفته، موجب افزایش فعالیت سیترات سنتاز و ظرفیت استقامتی طی دوچرخه‌سواری در حدود ۸۰ درصد VO_{2max} شده است (۳). همچنین، نتایج مطالعات انجام شده، نشان می‌دهد که انجام تمرینات HIIT برای مدت زمان طولانی‌تر می‌تواند باعث بهبود عملکرد، به همراه تغییر قابل توجه برخی متغیرهای فیزیولوژیک از قبیل LT، VT2، VT1 و VO_{2max} گردد (۱). Gibala و همکاران، با مقایسه تاثیر شش جلسه HIIT ($30 \times 4-6$) ثانیه در ۲۵۰ درصد VO_{2peak} ؛ ۴۰ دقیقه استراحت بین هر وهله تمرینی) و تمرین استقامتی تداومی (۱۲۰-۹۰ دقیقه دویدن در ۶۵ درصد VO_{2max}) در دو گروه از مردان فعال گزارش کردند که زمان اجرای تایم تریل دوچرخه سواری در هر دو گروه کاهش یافت. همچنین، نمونه‌برداری عضلانی افزایش در ظرفیت اکسایشی عضلانی را نشان داد. افزایش در ظرفیت بافری عضلانی و ظرفیت گلیکوزنی بین دو گروه مشابه بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با وجود اختلاف در حجم تمرین برای دو گروه، تمرینات تناوبی سرعتی باعث سازگاری‌های سریع‌تری در برخی اجزای

سوخت و ساز کربوهیدرات و چربی عضلات اسکلتی در مقایسه با تمرینات استقامتی تداومی سستی خواهد شد (۴). استفاده از برنامه‌های تمرینی کوتاه مدت که بتواند سازگاری‌های عملکردی مطلوب را در کوتاه‌ترین زمان ممکن به وجود آورد از اهمیت بسیاری برخوردار است. با این حال، در مقایسه با حجم گسترده مطالعاتی که سازگاری‌های فیزیولوژیکی به تمرینات استقامتی را در افراد غیر ورزشکار و ورزشکار شرح داده‌اند، مطالعات نسبتاً اندکی، پاسخ‌های عملکردی و فیزیولوژیک به تمرینات HIIT را بررسی کرده‌اند. علاوه بر تلاش محققان برای استفاده از روش‌های تمرینی دارای کارایی بالاتر، آنها به دنبال دستیابی به شاخص‌ها و روش‌های نوینی برای ارزیابی مناسب سازگاری با تمرینات ورزشی هستند (۵). در این راستا، microRNA ها یا به اختصار miRNA ها مولکول‌های RNA کوتاهی با طول ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن‌های مختلف به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی گستره وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی شامل تکامل اولیه سلولی، تمایز سلولی، تکثیر و آپوپتوز عمل می‌کنند. بنابراین تغییر بیان miRNA ها نقش مهمی را در فرآیندهای فیزیولوژیک و سوخت و ساز مختلف از جمله بسیاری از سازگاری‌ها با تمرینات ورزشی و بیماری‌های مختلف (از جمله سرطان) ایفا می‌کند. از این رو مطالعات بسیاری در جهت بررسی بیولوژی و عملکرد این دسته از RNA ها انجام شده است. همین‌طور تلاش‌های چشم‌گیری به منظور توسعه روش‌های تشخیص و سنجش آنها صورت گرفته است (۶). میزان جفت شدن miRNA با هدفش عامل اصلی در تشخیص ساز و کار کنش متقابل بین mRNA-miRNA است. در صورتی که mRNA هدف تقریباً به صورت کامل با miRNA جفت شود، شکسته و تجزیه می‌شود در غیر این صورت از ترجمه آن جلوگیری می‌شود. miRNA اصولاً از ناحیه 3'-UTR به ژن هدف متصل می‌شود، با این حال بررسی‌ها نشان داده است که miRNA ها می‌توانند به 5'-UTR و توالی‌های کد کننده نیز متصل شوند اما اطلاعات کمی در این زمینه در دسترس است. بنابراین یک miRNA ممکن است صدها miRNA را تنظیم کند و در نتیجه شبکه‌هایی از بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد. آن چه واضح است این است که بیولوژی miRNA بسیار پیچیده و در عین حال سازمان یافته در جهت تنظیم بیان شبکه‌های زیستی شامل تعیین سرنوشت سلولی، تکثیر و مرگ سلولی، ایفا می‌کند. علاوه بر این فرآیندهای ضروری، miRNA ها در فعالیت‌های سلولی مختلف مانند پاسخ ایمنی، ترشح انسولین، سنتز میانجی‌های عصبی و ریتم شبانه‌روزی نقش دارند. miRNA ها همچنین می‌توانند مسیرهای انکوژنی یا سرکوبگر تومورها را کنترل کنند. این مسئله در حالی

باشد. با این حال تاکنون مطالعه‌ای در این رابطه صورت نگرفته است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر غلظت *miRNA-1* و *miRNA-21* پسران نوجوان غیر فعال صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

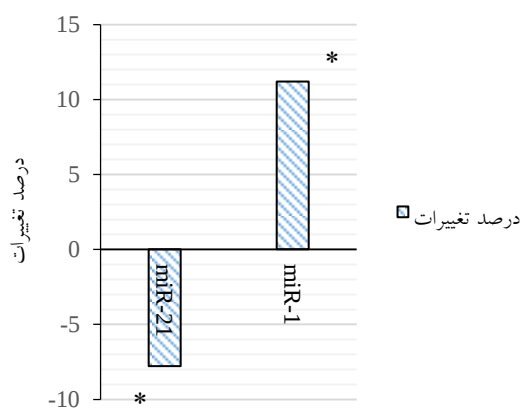
در مطالعه حاضر از میان دانش‌آموزان پسر نوجوان شهر خرم‌آباد، پس از شرح کامل موضوع، اهداف و روش تحقیق و پرسش و پاسخ‌های متعدد، با در نظر گرفتن معیارهای سن و شاخص‌های پیکرسنجی شامل قد، وزن و درصد چربی انتخاب شدند. حجم نمونه مناسب بر اساس مطالعات قبلی، در سطح معنی داری (آلفا یا خطای نوع اول) پنج درصد و توان (بتا یا خطای نوع دوم) تعیین شد. سپس تعداد ۲۲ نوجوان غیر فعال سالم و واجد شرایط با در نظر گرفتن امکان انصراف داوطلبین پس از تکمیل فرم رضایت آگاهانه توسط والدین و پرسشنامه سلامتی به عنوان آزمودنی در نظر گرفته شدند. سپس، با حضور در محل آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی شاخص‌های قد، وزن و درصد چربی آزمودنی‌ها اندازه‌گیری شد. پیش از شروع تمرینات توصیه‌هایی در مورد متعادل بودن وعده‌های غذایی و خواب شبانه کافی (۸-۹ ساعت) به آزمودنی‌ها و والدین‌شان داده شد. در ادامه آزمودنی‌ها به صورت تصادفی و بر اساس غلظت VO_{2max} و IGF-I و کنترل بی‌هوای اوج در دو گروه همسان ۱۱ نفره تمرین HIIT و کنترل (بدون فعالیت) جایگزین شدند. همه این افراد با هدف آشناسازی و افزایش آمادگی اولیه در یک برنامه تمرین تداومی هوازی (با شدت ۶۰-۶۵ درصد ضربان قلب ذخیره به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه، ۳ جلسه در هفته) به مدت دو هفته شرکت کردند. سپس آزمودنی‌ها در یک برنامه هشت هفته‌ای (هر هفته شامل ۳-۴ جلسه تمرین HIIT شرکت کردند. هر جلسه برنامه تمرین تناوبی بی‌هوازی شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن (شامل حرکات کششی، درجا زدن و حرکات جنبشی)، ۸-۶ تکرار دویدن ۳۰-۶۰ ثانیه‌ای با شدت تمام و ۴-۳/۵ دقیقه استراحت بین هر تکرار) و بخش بازگشت به حالت اولیه بود. در اولین هفته برنامه تمرینی تناوبی شدید، آزمودنی‌ها شش مرتبه و هر مرتبه به مدت ۳۰ ثانیه با تمام توان می‌دویدند. پس از چهار هفته به تدریج مدت زمان دویدن به ۴۵ ثانیه و در نهایت در دو هفته نهایی تمرینات به ۶ تا ۸ تکرار ۶۰ ثانیه‌ای تبدیل گردید. طی هر جلسه تمرینی ابتدا ۳-۴ تکرار دویدن با تمام توان با ۳/۵ دقیقه استراحت بین هر تکرار اجرا شد و سپس آزمودنی‌های نوجوان ۵ دقیقه استراحت داشته و ۳-۴ تکرار دویدن بعدی را اجرا نمودند (۱۴). رژیم غذایی روزانه آزمودنی‌ها طی دوره تحقیق (با استفاده از پرسشنامه‌ی یادآمد تغذیه‌ای ۲۴ ساعته) کنترل شد. همه آزمودنی‌های در حین تمرینات بدنی هیچ محدودیتی در رابطه با دسترسی و نوشیدن آب نداشتند. خون‌گیری

است که خود *miRNA* ها می‌توانند به وسیله آنکوژن‌ها یا سرکوبگرهای تومور تنظیم شوند (۷). در راستای بررسی پاسخ و سازگاری این شاخص با تمرینات ورزشی، چندین مطالعه تأثیر تمرینات ورزشی بر پاسخ و سازگاری *miRNA* را بررسی و نتایج متفاوتی را گزارش کرده‌اند (۸، ۹). *miRNA-1* یکی از اصلی‌ترین *miRNA* هایی است که در مطالعات متعددی به عنوان شاخص ارزیابی سازگاری با تمرینات ورزشی و بررسی پاسخ‌های زیستی به تمرینات ورزشی مورد ارزیابی قرار گرفته است. به عنوان مثال، McCarthy و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که در اثر یک دوره اضافه‌بار عملکردی میزان بیان *miRNA-1* به طور معنی‌داری در عضلات نعلی و پلاتناریس کاهش می‌یابد (۱۰). با این حال، Drummond و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که میزان بیان *miRNA-1* تقریباً ۳-۶ ساعت پس از فعالیت ورزشی در نمونه‌های انسانی جوان کاهش می‌یابد، اما در نمونه‌های مسن تغییر معنی‌داری ندارد، هرچند علاوه بر متغیر مستقل فعالیت بدنی در این تحقیق مصرف اسیدهای آمینه شاخه دار نیز تجویز شد (۱۱). در پژوهش دیگری گزارش شد که یک جلسه فعالیت ورزشی استقامتی باعث افزایش معنی‌دار بیان *miRNA-1* در عضلات فعال می‌شود (۱۲). Nielsen در نمونه‌های انسانی مشاهده کرد که بیان *miRNA-1* در بلافاصله و ۲۴۰ دقیقه پس از یک جلسه تمرین استقامتی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد اما در ۶۰ دقیقه بعد از تمرین به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد، در حالی که بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی این روند مقداری متفاوت بود به این صورت که میزان بیان *miRNA-1* در همان زمان‌های ذکر شده، تحت تأثیر همان جلسه حاد استقامتی قرار نمی‌گیرد (۱۳). همچنین، *miRNA-21* یکی دیگر از اجزای این گروه از متغیرها است به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. *miRNA-21* باعث تحریک تکثیر و تهاجم سلولی شده و Apoptosis سلولی را مهار می‌کند. بنابراین این مولکول به عنوان یک Oncomir شناخته می‌شود. همچنین افزایش این *miRNA* باعث کاهش بیان پروتئین‌های بازدارنده تومور و افزایش بیان پروتئین‌های آنکوژن می‌شود. با توجه به افزایش بیان این آنکوژم در بافت‌های سرطانی می‌توان از آن برای تشخیص به موقع و پیشگیری از متاستاز بهره برد و چون این *miRNA* بر سلول‌های تومور اثر گذاشته و خاصیت آنکوژنی و ضد آپوپتوزی دارد باعث اختلال در مسیر آپوپتوز می‌گردد که به نفع بقای سلول سرطانی می‌باشد. نقش ضد آپوپتوزی این بیومارکر تا حدی نامشخص باقی مانده است؛ با این وجود، با توجه به اطلاعات فوق تحقیقات روی آن می‌تواند چشم‌اندازی در تشخیص مراحل اولیه و درمان سرطان باشد (۷). همچنین، باید خاطر نشان شود که تأثیر تمرینات HIIT در دوره نوجوانی و پیش از بلوغ ممکن است اثرات مهمی بر سطح سلامتی و دستیابی به سقف تعیین شده توسط عوامل ژنتیکی داشته

شاپیرو بررسی و پس از تایید طبیعی بودن توزیع داده‌ها تفاوت‌های درون گروهی و بین گروهی با استفاده از آزمون‌های پارامتریک مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول شماره ۱ مشخصات پیکرشناختی آزمودنی‌ها ارائه شده است. به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت بین میانگین و دامنه تغییرات miRNA-1 و miRNA-21 قبل و بعد از هشت هفته تمرین HIIT معنی‌دار بوده است. همچنین، بیان miRNA-21 به طور معنی‌داری کاهش یافته است، در حالی که miRNA-1 به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.05$) (نمودار ۱). میانگین و دامنه تغییرات miRNA-1 و miRNA-21 گروه کنترل و HIIT تفاوت معنی‌داری نشان نداد، اما پس از هشت هفته تفاوت بین گروه HIIT و کنترل دامنه تغییرات miRNA-1 و miRNA-21 معنی‌دار بود.

جدول شماره ۱: مشخصات آنترپومتریک و فیزیولوژیک آزمودنی‌ها (هر گروه ۱۱ نفر)

شاخص‌ها	میانگین	انحراف استاندارد
سن (سال)	۱۵/۶	۰/۶
وزن (کیلوگرم)	۶۲/۷	۱۵/۱
قد (سانتی‌متر)	۱۶۹	۳/۹
درصد چربی (%)	۱۷/۹	۳/۳



نمودار ۱: تغییرات بیان miRNA-21 و miRNA-1 قبل و بعد از تمرینات HIIT * معنی‌داری درون گروهی در سطح ($P < 0.05$).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت بین میانگین و دامنه تغییرات غلظت miRNA-1 و miRNA-21 قبل و بعد از هشت هفته تمرین HIIT معنی‌دار بوده و غلظت مقادیر پایه سرمی miRNA-21 به طور معنی‌داری کاهش و غلظت miRNA-1 به طرز معنی‌داری افزایش یافته است. از اینرو، می‌توان ابراز داشت که هشت هفته تمرین تناوبی شدید موجب کاهش معنی‌دار miRNA-21 سرمی پسران نوجوان گردیده است. برخی مطالعات افزایش غلظت miRNA-21 را پس از یک وهله فعالیت ورزشی مختلف

۸-۲۴ ساعت قبل از اولین و آخرین جلسه تمرینی (ساعت ۹-۸ صبح روز بعد) انجام شد. نمونه‌گیری‌ها به مقدار ۳-۴ میلی‌لیتر خون از ورید آنته کوربیتال (بدون افزودن ماده ضد انعقاد جهت جداسازی سرم) انجام شد. تمام نمونه‌های خونی بعد از لخته شدن در دمای محیط، برای جداسازی سرم در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفتند. نمونه‌های سرمی تا زمان اندازه‌گیری غلظت miRNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج RNA از نمونه‌های خونی، به ۶۰ میلی‌لیتر از نمونه داخل میکروتیوب، ۱ میلی‌لیتر تریزول اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد سپس ۰/۲ میلی‌لیتر به آن کلروفرم اضافه شد و حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAasefree انتقال داده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول اضافه شد و بعد از هم زدن در دمای ۲۰- باقی ماندند. روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ مجدداً سانتریفیوژ شدند. با سمپلر مایع رویی با دقت خارج شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص به آن اضافه شد و بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه شد و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقیمانده اتانول تبخیر شود و داخل میکروتیوب خشک شود، بعد از این مرحله ۵۰ لاند آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۶/۱ تا ۸/۱ بود. کیت‌ها دقیقاً قبل از استفاده از یخچال ۲۰- خارج می‌شدند و بعد از استفاده به داخل یخچال منتقل می‌شدند. تمام سمپلرها طبق زمانبندی‌های گروه کالیبره شده بودند. برای رونویسی RNA به cDNA از کیت شرکت Exiqon استفاده و تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای ارزیابی بیان ژن از تکنیک PCR Time Real و دستگاه شرکت Biosystem Applied استفاده شد. mix master Green SYB استفاده شده بود. طبق استفاده شده در این مرحله متعلق به شرکت Exiqon بود. طبق دستورالعمل کیت برای یک نمونه ۱۰ لاندای ترکیبی از mix master پرایمر و cDNA در نظر گرفته شد و میزان بیان miRNA-1 و miRNA-21 نسبت به گروه کنترل و مرحله قبل از تمرین استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارزیابی شد. آزمون‌های ویلک-شاپیرو و لوین برای تعیین وضعیت توزیع و همگنی واریانس‌ها و از آزمون تحلیل واریانس (2×2) برای ارزیابی تغییرات درون و بین گروهی شاخص‌های اندازه‌گیری شده استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ در سطح $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند. ابتدا وضعیت توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون ویلک-

به ویژه وهله‌های ورزشی استقامتی و شدید گزارش کرده‌اند (۸، ۱۵، ۱۶). برای مثال، Baggish و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که پس از یک وهله دوچرخه‌سواری تا واماندگی، غلظت *miRNA-21* به طور قابل توجهی (۱/۹ برابر افزایش یافته است (۸). با این حال، نتایج بیشتر این مطالعات نشان داده است که این افزایش تنها یک پاسخ موقت و گذار بوده و غلظت آن پس از حدود یک ساعت به مقدار پیش از فعالیت ورزشی رسیده است و افزایش ناشی از ورزش سطوح *miRNA-21* نمی‌تواند نشان دهنده سطوح حالت پایه (استراحتی) و سازگاری به وجود آمده در این شاخص بر اثر تمرینات ورزشی باشد (۸). با این حال، برخی محققان مانند باگیش گزارش کرده‌اند که این پاسخ و افزایش ۲۴ ساعته ممکن است تنها نشان‌دهنده یک پاسخ کوتاه مدت به جلسه تمرین ورزشی باشد و همچنین پس از ۱۲ هفته تمرین استقامتی سطوح استراحتی *miRNA-21* کاهش یافته بود و پاسخ حاد آن به یک ساعت فعالیت دوچرخه‌سواری در ۶۵ درصد توان بیشینه (P_{max}) در آزمودنی‌های تمرین کرده تفاوتی نداشت (۱۷). تاثیر دقیق انواع مختلف فعالیت ورزشی و تاثیر حجم و شدت فعالیت ورزشی بر پاسخ و سازگاری *miRNA* ها به طور دقیق مشخص نشده است. با این حال، در یک مطالعه گزارش شده است که تمرینات سرعتی شدید موجب بیشترین افزایش در غلظت *miRNA-21* و *miRNA-1* سرمی گردید (۱۶). همچنین، در برخی مطالعات نشان داده شده است که دوره زمانی تغییرات در *miRNA* ها با تغییرات سایر عوامل هورمونی مرتبط با رشد به ویژه در طی فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی دارای شباهت زیادی است (۱۸). سازوکارهای مختلفی برای افزایش *miRNA* های ناشی از فعالیت ورزشی گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به بروز آسیب عضلانی و شروع فرآیندهای رونویسی اشاره نمود (۱۹). Cui و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که در طی فعالیت ورزشی غلظت *miRNA* ها ممکن است بر اساس تعادل بین برداشت/رهایش سلولی یا بر اثر تعادل کاتابولیسم و آنابولیسم بین بافت‌های مختلف بدن تعیین شود (۲۰). به علاوه، یکی دیگر از فرضیاتی که به عنوان دلایل افزایش غلظت *miRNA* ها در طی یک وهله فعالیت ورزشی گزارش شده است بروز هیپوکسی کوتاه مدت و موضعی است که در سطح بافت عضلانی روی می‌دهد و موجب رهایش انواع مختلف *miRNA* از بافت عضلانی به درون گردش خون می‌گردد. همچنین، Nicoli و همکاران (۲۰۱۰) نقش *miRNA-21* در بروز آثار رشدی آن از طریق انسجام بین پاسخ‌های همودینامیک عروقی و پیام‌رسانی عامل رشد اندوتلیالی عروقی (VEGF) و تقویت آثار GH و IGF-I را مورد تایید قرار داده است و گزارش شده است که غلظت بسیاری از *miRNA* ها و به ویژه *miRNA-2* با افزایش عملکرد عوامل هورمونی مرتبط با رشد دارای ارتباط نزدیکی است (۲۱). با این حال، برخی محققان

گزارش کرده‌اند که *miRNA* ها ممکن است نه تنها توسط فعالیت ورزشی حاد بلکه توسط تمرینات ورزشی طولانی مدت نیز تحت تاثیر قرار نگیرند و تفاوتی نیز بین تمرینات مختلف وجود نداشته باشد. همچنین، *miRNA-1* از طریق افزایش تمایز و تکثیر میوبلاست‌های اولیه و سلول‌های ماهواره‌ای می‌تواند به تمایز سلول‌های عضلانی کمک نماید (۲۲). علاوه بر این، وضعیت انرژی سلول و در نتیجه فعال‌سازی پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات (AMPK) احتمالاً نقش مهمی در بروز آثار مرتبط با *miRNA* ها دارد. AMPK برای تثبیت RNA پیامبر VEGF القا شده بر اثر هیپوکسی ضروری است، اما مهار AMPK موجب تقویت پاسخ RNA پیامبر VEGF به فعالیت ورزشی حاد می‌گردد (۲۳). این مسئله احتمالاً توضیح می‌دهد که چرا تمرینات بسیار شدید در واقع اثر منفی بر سطوح VEGF و اثر افزایشی بیشتری بر سطوح IGF-I دارند (۲۴). از سوی دیگر، این مطلب همچنین یکی از دلایلی است که تمرینات HIIT، با سرعت بیشتری موجب افزایش چگالی مویرگی و ظرفیت اکسایشی عضله اسکلتی در پاسخ به ترشح عوامل رشدی موضعی و در گردش می‌گردد (در هر دو دوره بازگشت به حالت اولیه و طی فعالیت ورزشی) (۲۵). علاوه بر این، محرک‌های مکانیکی همانند بار کل تحمیل شده به عضله و جریان خون عضله اسکلتی و در نتیجه استرس فرسایشی (shear stress) ایجاد شده در طی فعالیت بدنی موجب افزایش سطوح *miRNA* ها، mRNA ها و پروتئین‌های مرتبط با آنها می‌گردد (۷). علاوه بر مباحث فوق، در راستای نتایج مطالعه حاضر برخی مطالعات نشان داده‌اند که سطوح در گردش *miRNA-21* و *miRNA-1* افراد دارای آمادگی جسمانی پایین به ترتیب به طور قابل توجهی بیشتر و کمتر از مقادیر آن در افراد تمرین کرده و دارای سطوح آمادگی بالاتر است. همچنین، میزان *miRNA-21* در طی بروز هیپرتروفی قلبی پاتولوژیک به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و به عنوان نشانگر زیستی بروز استرس اکسایشی، التهاب و ایجاد وضعیت پاتولوژیک در کاردیومیوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیالی در نظر گرفته می‌شود. از این رو، محققان معتقدند که *miRNA-21* و *miRNA-1* را می‌توان به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای ارزیابی میزان بروز سازگاری تمرینی و افزایش آمادگی جسمانی (در سطح سلولی) در نظر گرفت (۲۶-۲۸). منبع سلولی دقیق اندازه‌گیری و رهایش *miRNA-21* و *miRNA-1* مشخص نشده است و نیازمند انجام مطالعات بیشتری در سطح مدل‌های انسانی و حیوانی است. با این حال، برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که *miRNA-21* از بافت‌های مختلفی به ویژه سلول‌های اندوتلیال بافت‌های عروقی به میزان بالایی به درون گردش خون آزاد می‌شود. علاوه بر این، یکی دیگر از منابع تولید *miRNA-21* بافت عضله قلبی است (۸). به علاوه، افزایش بیش از حد غلظت *miRNA-21* بیان چندین پروتئین کلیدی درگیر در

میزان سازگاری با تمرینات ورزشی در پسران نوجوان نابالغ باشد. با این حال، به نظر می‌رسد برای تعیین میزان دقیق رابطه و تاثیر انواع مختلف تمرینات ورزشی بر این شاخص‌ها به انجام تحقیقات بیشتری نیاز است.

قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجویی دکتری در دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تبریز می‌باشد. از تمام افرادی که در این تحقیق همکاری کرده‌اند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. ملاحظات اخلاقی: پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استان آذربایجان شرقی به شماره مرجع IR.TBZMED.REC.1396.258 به تایید رسیده است.

منابع مالی: منابع مالی این طرح تحقیقاتی توسط نویسندگان تامین شده است.

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

مشارکت مؤلفان: ۱. رامین امیرساسان به عنوان استاد راهنما در انتخاب موضوع، طراحی پروتکل، تحلیل نتایج و تدوین مقاله و ۲. مصطفی آرمان‌فر در انتخاب موضوع، طراحی پروتکل، اجرا، تحلیل نتایج و تدوین مقاله و ۳. جواد حصاری به عنوان استاد مشاور در طراحی و اجرای پروتکل تحقیق نقش داشتند، همچنین، اساتید راهنما و مشاور مقاله نسخه نهایی تهیه شده را خوانده و تایید کرده‌اند.

مسیرهای عمومی مرتبط با رشد و نمو سلولی (از قبیل مسیرهای پیام‌رسانی Wnt، ErbB، mTOR، β -TGF، MAPK، ایمنی (پیام‌رسانی سلول‌های B و T) و استرس (مسیر p53) را مهار می‌کند. با این حال، این نکته باید خاطر نشان شود که اطلاعات محدودی درباره منشأ miRNA‌های در گردش خون و نقش‌های فیزیولوژیک آنها وجود دارد؛ در نتیجه نتایج به دست آمده تا زمان به دست آمده اطلاعات بیشتر باید با احتیاط مورد تفسیر قرار گیرند (۲۹). مطالعات آینده باید نقش سایر miRNAها، به صورت جداگانه یا در ترکیب با یکدیگر، بر سازگاری با فعالیت ورزش را بررسی کنند. همچنین، باید استفاده از فناوری‌های جایگزین برای دستکاری گونه‌های مختلف miRNA در داخل بدن، و نیز استفاده در مدل‌های داخل بدن مختلف را برای شناسایی miRNA‌های مختلف درگیر در سازگاری با تمرینات ورزشی و بهبود عملکرد ورزشی مورد ارزیابی و بررسی قرار دهند. همچنین، برخی از مطالعات اولیه همبستگی خطی مثبتی را بین تغییرات ناشی از ورزش در سطوح miRNA-20a و نیز تغییرات ناشی از تمرین در VO_{2max} و سایر عوامل جسمانی مرتبط با آمادگی را نشان داده‌اند؛ این مسئله نشان می‌دهد که بین سطوح خونی انواع miRNA با تمرین‌پذیری نشانگرهای آمادگی قلبی-عروقی ارتباط وجود دارد و می‌تواند به عنوان نشانگرهای بالقوه ارزیابی سازگاری با تمرین استفاده شوند (۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از غلظت miRNA-1 و miRNA-21 ممکن است شاخص زیستی مناسبی برای ارزیابی

References

- Laursen P B, Jenkins D G. The scientific basis for high-intensity interval training. *Sports Med* 2002; 32(1): 53-73. doi: 10.2165/00007256-200232010-00003.
- Gibala M J, McGee S L. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exerc Sport Sci Rev* 2008; 36(2): 58-63. doi: 10.1097/JES.0b013e318168e c1f.
- Burgomaster K A, Hughes S C, Heigenhauser G J, Bradwell S N, Gibala M J. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. *J Appl Physiol* 2005; 98(6): 1985-1990. doi: 10.1152/jappphysiol.01095.
- Gibala M J, Little J P, Van Essen M, Wilkin G P, Burgomaster K A, Safdar A, et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J physiol* 2006; 575(3): 901-911. doi: 10.1113/jphysiol.2006.112094
- Hough P. High-intensity interval training. *Advanced Personal Training. Science to Practice* 2016: 149.
- Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- Prior B M, Yang H, Terjung R L. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 2004; 97(3): 1119-1128. doi: 10.1152/jappphysiol.00035.20 04
- Baggish A L, Hale A, Weiner R B, Lewis G D, Systrom D, Wang F, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J physiol* 2011; 589(16): 3983-3994. doi: 10.1113/jphysiol.2011.213363.
- Bye A, Røsjø H, Aspenes S T, Condorelli G, Omland T, Wisløff U. Circulating microRNAs and aerobic

- fitness—the HUNT-Study. *PloS one* 2013; **8**(2): e57496. doi: 10.1371/journal.pone.0057496.
10. McCarthy J J, Esser K A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2007; **102**(1): 306-313. doi: 10.1152/jappphysiol.00932.
 11. Drummond M J, McCarthy J J, Fry C S, Esser K A, Rasmussen B B. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol-Endoc M* 2008; **295**(6): E1333-E1340. doi: 10.1152/ajpendo.90562.20.08.
 12. Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga B P, Tarnopolsky M A. miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PloS one* 2009; **4**(5): e5610. doi: 10.1371/journal.pone.0005610
 13. Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Åkerström T, Nielsen A R, Pedersen B K, et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J physiol* 2010; **588**(20): 4029-4037. doi: 10.1113/jphysiol.2010.189860.
 14. Siahkoushian M, Khodadadi D, Shahmoradi K. Effects of high-intensity interval training on aerobic and anaerobic indices :Comparison of physically active and inactive men. *Sci & Sport* 2013; **28**(5): e119-e125. doi: 10.1016/j.scispo. 2012.11.006
 15. Tonevitsky A G, Maltseva D V, Abbasi A, Samatov T R, Sakharov D A, Shkurnikov M U, et al. Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC Physiol* 2013; **13**(1): 9. doi: 10.1186/1472-6793-13-9.
 16. Wahl P, Wehmeier U F, Jansen F J, Kilian Y, Bloch W, Werner N, et al. Acute Effects of Different Exercise Protocols on the Circulating Vascular microRNAs-16,-21, and-126 in Trained Subjects. *Front Physiol* 2016; **7**. doi: 10.3389/fphys.2016.00643
 17. Nielsen S, Åkerström T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen B K, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PloS one* 2014; **9**(2): e87308. doi: 10.1371/journal.pone.0087308.
 18. Wahl P, Mathes S, Köhler K, Achtzehn S, Bloch W, Mester J. Acute metabolic, hormonal, and psychological responses to different endurance training protocols. *Horm Metab Res* 2013;**45**(11): 827-833. doi: 10.1055/s-0033-1347242.s
 19. Uhlemann M, Möbius-Winkler S, Fikenzer S, Adam J, Redlich M, Möhlenkamp S, et al. Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur J Prev Cardiol* 2014; **21**(4): 484-491 doi: 10.1177/2047487312467902
 20. Cui S F, Wang C, Yin X, Tian D, Lu Q J, Zhang C Y, et al. Similar responses of circulating microRNAs to acute high-intensity interval exercise and vigorous-intensity continuous exercise. *Front physiol* 2016; **7**: 102. doi: 10.3389 /fphys.2016.00102
 21. Nicoli S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, Fogarty K E, Lawson N D. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. *Nature* 2010; **464** (7292): 1196-1200. doi: 10.1038/nature08889
 22. Aoi W, Ichikawa H, Mune K, Tanimura Y, Mizushima K, Naito Y, et al. Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. *Front Physiol* 2013; **4**: 80. doi: 10.3389/fphys.2013.00080.
 23. Zwetsloot K A, Westerkamp L M, Holmes B F, Gavin T P. AMPK regulates basal skeletal muscle capillarization and VEGF expression, but is not necessary for the angiogenic response to exercise. *J Physiol* 2008; **586**(24): 6021-6035. doi: 10.1113/jphysiol.2008.159871
 24. Gliemann L, Gunnarsson T P, Hellsten Y, Bangsbo J. 10-20-30 training increases performance and lowers blood pressure and VEGF in runners. *Scand J Med Sci Spor* 2015; **25**(5): e479-e489. doi: 10.1111/sms.12356
 25. Jensen L, Bangsbo J, Hellsten Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *J physiol* 2004; **557**(2): 571-582. doi: 10.1113/ jphysiol.2003. 057711
 26. Tatsuguchi M, Seok H Y, Callis T E, Thomson J M, Chen J-F, Newman M, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J mol cell cardiol* 2007; **42**(6): 1137-1141. doi: 10.1016/j.yjmcc. 2007.04.004
 27. Sayed D, Hong C, Chen I-Y, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007; **100**(3): 416-424. doi: 10.1161/01. RES.0000257913.42552.23
 28. Weber M, Baker M B, Moore J P, Searles C D. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Bioph Res Co* 2010; **393**(4): 643-648. doi: 10.1016/j. bbrc.2010.02.045
 29. Baggish A L, Park J, Min P-K, Isaacs S, Parker B A, Thompson P D, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2014; **116**(5): 522-531. doi: 10.1007/s00216-013-7340-0.

The N-acetylgalactosamine-transferase11 (GALNT11) activation in leukemia and the role of cyclophosphamide and cytarabine in expression of this enzyme

Shrooz Amin Mozaffari^{1,2}, Roya Bazzaz Dehkharghani³, Fatemeh Ramezani⁴, Nasser Samadi^{1,2,4*}

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

²Msc Student of Biochemistry, Department of Biochemistry, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Biochemistry, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

⁴Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

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

Received: 10 October 2017 Accepted: 13 January 2018 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):24-30

Abstract

Background: We investigated the activation of N-acetylgalactosamine-transferase11 (GALNT11) and the role of cyclophosphamide and cytarabine in expression of this enzyme in AML and CML patients.

Methods: GALNT11 activity and expression levels were evaluated in human chronic myelogenous leukemia cells (K562) and human acute monocytic leukemia cells (THP1) after incubation with different concentrations of cyclophosphamide (Cyclo) and cytarabine (Cyta). Anti-proliferative effects of Cyclo and Cyta were examined by MTT assay. Real time-PCR and ELISA assays were applied to investigate the expression and activity of GALNT11, respectively.

Results: The IC50 values for Cyclo were 34.73±0.12 µM for K562 and 36.16±0.23 µM for THP1 cells. These values for Cyta were also 0.38±0.15 µM for K562 and 0.52±0.18 µM for THP1 cells.

Conclusion: The activation and expression of GALNT11 increased in acute and chronic leukemia as glycosylation disorders. Also cyclophosphamide and specially cytarabine cause significant increase in activation and expression of GALNT11 which inhibits glycosylation and tumorigenesis dependent signaling pathway.

Keyword: Cyclophosphamide, Cytarabine, Leukemia, N-acetylgalactosamine-transferase11.

How to cite this article: Mozaffari Sh A, Bazzaz Dehkharghani R, Ramezani F, Samadi N. [The N-acetylgalactosamine-transferase11 (GALNT11) activation in leukemia and the role of cyclophosphamide and cytarabine in expression of this enzyme]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August-September; 41(3):24-30. Persian.

مقاله پژوهشی

فعالیت آنزیم N-استیل گالاکتوز امین ترانسفراز ۱۱ در لوسمی و تاثیر سیکلوفسفامید و سیتارابین بر بیان این آنزیم

شهرزاد امین مظفری^{۱b}، رویا بزاز دهخوارقانی^۲، فاطمه رضانی^۳، ناصر صمدی^۴ و^{۱a}

^۱ مرکز تحقیقات سلولهای بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز، تبریز، ایران
^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳ گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، تهران، ایران
^۴ مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز، تبریز، ایران
 * نویسنده مسوول: ایمیل: drmsamadi@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۲۴-۳۰

چکیده

زمینه: در این مطالعه به بررسی فعالیت آنزیم N-استیل گالاکتوز امین ترانسفراز ۱۱ در لوسمی میلویید و تاثیر سیکلوفسفامید و سیتارابین بر بیان این آنزیم در AML و CML پرداخته شده است.

روش کار: میزان فعالیت و بیان GALNT11 در سلولهای انسانی K562 (سلولهای لوسمی میلوژنوس مزمن) و THP1 (سلولهای لوسمی مونوسیتیک حاد)، پس از انکوباسیون با غلظتهای مختلف سیکلوفسفامید و سیتارابین ارزیابی گردید. بررسی اثرات آنتی پرولیفراتیو سیکلوفسفامید و سیتارابین با استفاده از تکنیک MTT انجام شد و جهت ارزیابی بیان و فعالیت GALNT11، از Real Time PCR و روش ELISA استفاده گردید.

یافته‌ها: مقادیر IC50 برای سیکلوفسفامید در سلولهای THP1 و K562 به ترتیب $36/16 \pm 0/23 \mu\text{m}$ و $34/73 \pm 0/12 \mu\text{m}$ بوده و در مورد سیتارابین این مقادیر به ترتیب $0/52 \pm 0/18 \mu\text{m}$ برای سلولهای THP1 و $0/38 \pm 0/15 \mu\text{m}$ برای سلولهای K562 بود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج حاصل از این مطالعه، فعالیت و بیان آنزیم GALNT11 در لوسمی حاد و مزمن افزایش می‌یابد که بیانگر اختلال در گلیکوزیلاسیون می‌باشد. همچنین سیکلوفسفامید و بویژه سیتارابین منجر به کاهش فعالیت آنزیمی و بیان ژن GALNT11 می‌گردند. این عمل باعث مهار گلیکوزیلاسیون و آغاز مسیر سیگنالینگ تومورزایی را می‌گیرد.

کلید واژه‌ها: سیکلوفسفامید، سیتارابین، لوسمی، N-استیل گالاکتوز امین - ترانسفراز ۱۱

نحوه استناد به این مقاله: امین مظفری ش، بزاز دهخوارقانی ر، رضانی ف، صمدی ن. فعالیت آنزیم N-استیل گالاکتوز امین ترانسفراز ۱۱ در لوسمی و تاثیر سیکلوفسفامید و سیتارابین بر بیان این آنزیم. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۲۴-۳۰

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتو 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

برای تشخیص و سیر درمانی در اکثر سرطان‌ها از طبقه‌بندی TNM (تومور، گره‌ها و متاستاز) استفاده می‌شود (۱). به علت تفاوت‌های بالینی قابل توجه در بین بیماران مبتلا به سرطان، پیش‌بینی میزان پاسخ بیمار به درمان، امری دشوار می‌باشد (۲). در طول سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری در جهت پی بردن به چگونگی تغییر در مکانیسم‌های بیوشیمیایی در سرطان صورت گرفته است (۳-۵). لوسمی نوع خاصی از سرطان بوده و منجر به تکثیر کنترل نشده‌ی سلول‌های خونی غیرطبیعی می‌گردد (۶-۷). از آنجاییکه لوسمی از جمله سرطان‌هایی است که تومور جامد تولید نمی‌کند، لذا تشخیص آن در مراحل اولیه، امر مهمی در پیش‌بینی پیشرفت بیماری و درمان دارویی بشمار می‌رود (۸).

یکی از رخدادهای عمده در سلول‌های سرطانی، اختلال در بیان آنتی‌ژنها، مانند Tn آنتی‌ژن (بعنوان محصول مرحله‌ی اول ۰- گلیکوزیلاسیون) در نتیجه‌ی عدم کفایت ۰- گلیکوزیلاسیون است (۹). واکنش تولید Tn آنتی‌ژن، توسط خانواده‌ی آنزیمی پلی پپتید N استیل گالاکتوز آمین ترانسفراز (GahNac-Ts) کاتالیز می‌شود.

ملکول‌های کربوهیدرات موجود در سطح سلول‌های توموری، متفاوت از بقیه سلول‌ها بوده و گروه‌های کربوهیدراتی مختلف باعث تغییرات شدیدی در این سلول‌ها می‌گردند. بنابراین یکی از تغییرات قابل توجه در سلول‌های سرطانی، بیان نامناسب آنتی‌ژنها بدلیل اختلال در گلیکوزیلاسیون می‌باشد که این امر منجر به مقاومت دارویی می‌گردد (۸). یکی از O- گلیکان‌های غیرطبیعی که با افزایش بیان، اختلالات متعددی را در انسان ایجاد کرده و کارسینوژن است، Tn آنتی‌ژن می‌باشد. Tn آنتی‌ژن بوسیله‌ی خانواده‌ی آنزیمی پلی پپتید N استیل گالاکتوز آمین ترانسفراز سنتز می‌شود، این آنزیم‌ها باعث انتقال واحد N- استیل گالاکتوز آمین از N-UDP - استیل گالاکتوز آمین به آمینو اسید سرین یا ترئونین در یک پروتئین می‌گردند. در انسان و موش، ۱۲ نوع از این گروه آنزیمی وجود دارد. تمام اعضای این خانواده پروتئین‌های غشایی بوده و دارای یک N- ترمینال سیتوپلاسمی، یک ناحیه‌ی هیدروفوب که از غشاء دستگاه گلژی عبور می‌کند و بخشی کاتالیتیک در لومن دستگاه گلژی می‌باشند. در این گروه، تمام ایزوفرم‌ها ویژگی و بیان خاصی داشته و با توجه به ارگان و سلول مورد نظر عملکرد متفاوتی دارند. برخی از این آنزیم‌ها در ارتباط با بدخیمی‌ها بوده و بعنوان آنزیم شاخص مطرح می‌باشند. در ادامه‌ی مطالعه‌ی اخیر در خصوص عملکرد آنزیم N- استیل گالاکتوز آمین - ترانسفراز ۱۱، در این تحقیق نیز به بررسی بیان ژن و فعالیت این آنزیم در بیماران مبتلا به لوسمی حاد و مزمن و همچنین رده‌ی سلول‌های سرطانی پرداخته‌ایم.

باتوجه به مشهود بودن اختلالات گلیکوزیلاسیون در سرطان و همچنین با در نظر گرفتن افزایش فعالیت آنزیم N- استیل

گالاکتوز آمین ترانسفراز ۱۱ در لوسمی‌ها، هدف از این مطالعه، بررسی این آنزیم در لوسمی و همچنین کاهش بیان و فعالیت آنزیم فوق در بیماران مبتلا به AML و CML و در رده‌های سلول‌های لوسمی THP۱ و K۵۶۲، با استفاده از دو داروی سیکلوفسفامید و سیتارابین می‌باشد.

روش کار

سیکلوفسفامید، سیتارابین و Ficoll-metrizoate از شرکت AldrichSigma خریداری شد. رده‌های سلولی لوسمی انسانی ۱ THP و K۵۶۲ از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و محیط کشت RPMI۱۶۴۰، FBS، پودر MTT و کیت استخراج RNA (TRIZOL) از Invitrogen Life Technologies (نیوزیلند) تهیه گردید. PCR Master Mix از Applied Bio systems (UK)، کیت سنتز cDNA از فرمتاز، کیت ELISA از CUABIO خریداری شدند.

مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی و مقطعی بوده و نمونه‌های خون محیطی از ۳۰ بیمار در سه گروه ۱۰ نفره، از بیمارستان قاضی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردید. ۱۰ نمونه از بیماران مبتلا به CML، ۱۰ نمونه از افراد مبتلا به AML و ۱۰ نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل جمع‌آوری شد.

سلول‌های PBMC (سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی) توسط سانتریفیوژ با ۴۰۰g، از سلول‌های خون وریدی جدا شدند. سلول‌های K۵۶۲ و THP۱ در محیط کشت کامل، کشت داده شدند؛ رده سلولی K۵۶۲ در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ از FBS و ۱٪ از Pen-strep و رده سلولی THP۱ در DMEM حاوی ۱۰٪ از FBS و ۱٪ از Pen-strep و ۲- مرکاپتواتانل کشت داده شدند.

RNA از نمونه‌های خونی و رده‌های سلولی با استفاده از TRIZOL و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد، سپس cDNA با استفاده از کیت فرمتاز سنتز شد. واکنش PCRReal-time نیز در ۲۵ میکرولیتر از PCR Master Mix به انجام رسید. توالی پرایمر Forward به صورت $5' GGCACATGTCGTTGGAT 3'$ و توالی Reverse به صورت $5' AAACCCCAACAACCCATTT 3'$ بود. این پرایمرها در غلظت ۱۰۰nM برای بیان GALNT۱۱ و ۲۰۰nM برای بیان GAPDH مورد استفاده قرار گرفتند.

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین نمونه‌ها از Pico droplet برای ۹ گروه از نمونه‌ها انجام شد. این گروه‌ها شامل موارد زیر بودند: ۱۰ نمونه از بیماران AML، ۱۰ نمونه از بیماران CML، ۱۰ نمونه از افراد سالم، گروه رده سلولی K۵۶۲ تیمار شده با سیکلوفسفامید، گروه رده سلولی K۵۶۲ تیمار شده با سیتارابین، گروه رده سلولی K۵۶۲ تیمار نشده، گروه رده سلولی THP۱ تیمار شده با

کنترل، دو برابر می‌شود (تصویر ۱ - الف) از طرفی بیان GALNT11 در بیماران AML و CML به طور چشمگیری افزایش یافت (تصویر ۱ - ب).

به عنوان تیمار اولیه، سلول‌ها در حضور غلظت‌های مختلف از سیکلوفسفامید و سیتارابین ($1-16 \mu\text{M}$) کشت داده شدند. سمیت سلولی سیکلوفسفامید و سیتارابین بر روی دو رده سلولی با استفاده از تکنیک MTT بررسی شد. IC_{50} برای سیکلوفسفامید، در مورد سلول‌های K562، $34/33 \pm 0/12 \mu\text{M}$ و در مورد سلول‌های THP1، $36/16 \pm 0/23 \mu\text{M}$ بود (تصویر ۲ - الف). همچنین مقادیر IC_{50} برای سیتارابین، در مورد K562، $0/38 \pm 0/15 \mu\text{M}$ بود که نشان دهنده سمیت بیشتر این دارو در این رده سلولی می‌باشد. اما IC_{50} سیتارابین در مورد رده سلولی THP1، $0/52 \pm 0/18 \mu\text{M}$ بود. (تصویر ۲ - ب).

جهت بررسی چگونگی اثر سیکلوفسفامید و سیتارابین در کاهش فعالیت و میزان mRNA ی GALNT11، رده‌های سلولی K562 و THP1 با یک پنجم IC_{50} از هر دارو تیمار شدند که فعالیت این آنزیم پس از تیمار سلول‌ها با یک پنجم IC_{50} سیکلوفسفامید، در سلول‌های K562، دو برابر و در سلول‌های THP1، ۱/۷ برابر کاهش یافت. در حالی که به دنبال تیمار سلول‌ها با یک پنجم IC_{50} سیتارابین، فعالیت GALNT11 در هر دوره سلولی، به میزان دو برابر کم شد (تصویر ۳ - الف). بیان mRNA آنزیم استیل گالاکتوز آمین ترانسفراز ۱۱ در سلول‌های THP1 و K562 پس از تیمار سلول‌ها با یک پنجم IC_{50} سیکلوفسفامید و سیتارابین، به میزان قابل توجهی کم شد (تصویر ۳ - ب).

سیکلوفسفامید، گروه THP1 تیمار شده با سیتارابین و گروه رده سلولی THP1 تیمار نشده.

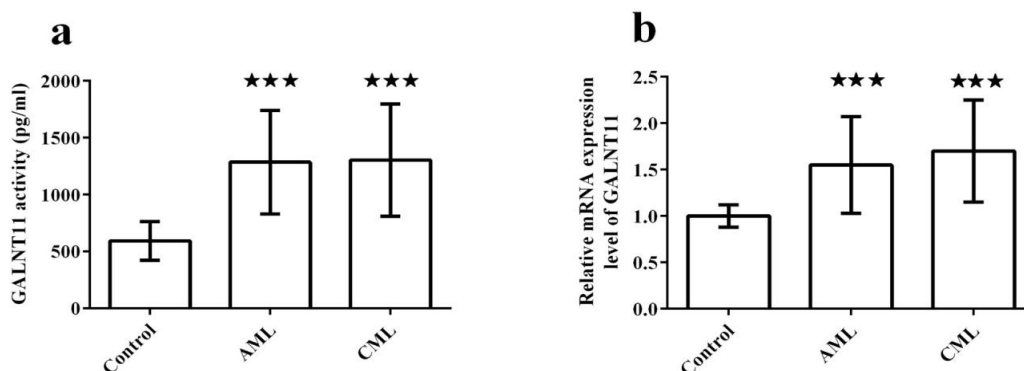
سطح آنزیم GALNT11 با استفاده از کیت ELISA اندازه‌گیری شد. مرحله لیز نمونه‌ها با تکنیک Freezing and thawing صورت گرفته و غلظت مساوی پروتئین از هر نمونه در هر well از پلیت ELISA لود شد.

بررسی سمیت سلولی: رده‌های سلولی لوسمی شامل THP1 و K562 در حضور غلظت‌های مختلف سیکلوفسفامید و سیتارابین ($1-16 \mu\text{M}$) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه‌گذاری شدند. تعداد 5×10^3 سلول در هر well از پلیت ۹۶ چاهکی لود شده و سپس با غلظت‌های گفته شده تیمار شدند. تکنیک MTT نیز به روش توضیح داده شده، انجام گردید.

داده‌ها به صورت انحراف استاندارد $\pm$ میانگین نشان داده شدند. برای محاسبه بیان نسبی ژن‌ها از مقادیر Ct و $\Delta\Delta\text{Ct}$ استفاده شد. ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ بیان) تفاوت معنی‌دار بیان GALNT11 با آزمون آماری ANOVA نشان داده شد. نرم افزار SPSS۲۰ نیز جهت آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت. $P < 0/05$ از نظر آماری، معنادار در نظر گرفته شد.

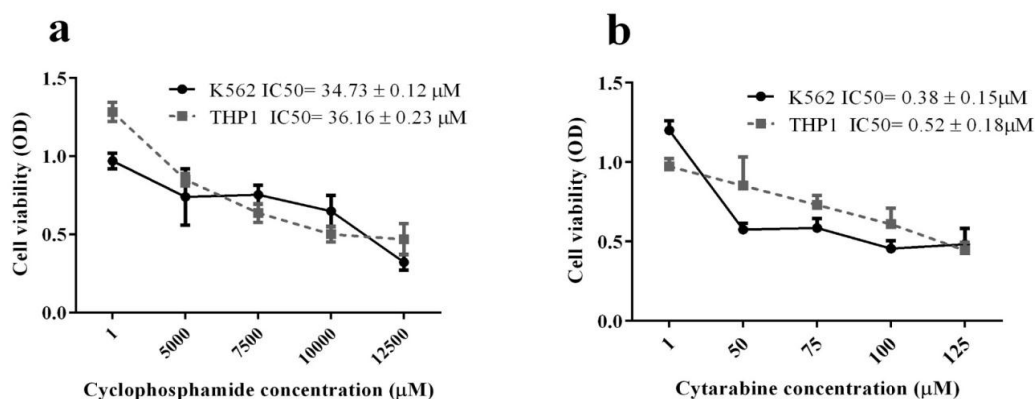
یافته‌ها

در این تحقیق، به بررسی فعالیت GALNT11 در ۱۰ بیمار AML و ۱۰ بیمار CML و ۱۰ فرد سالم، با استفاده از روش ELISA و همچنین به ارزیابی بیان آنزیم فوق در رده‌های سلولی K562 و THP1 توسط PCR پرداخته شد. نتایج ما نشان داد که فعالیت این آنزیم در بیماران مبتلا به لوسمی در مقایسه با گروه



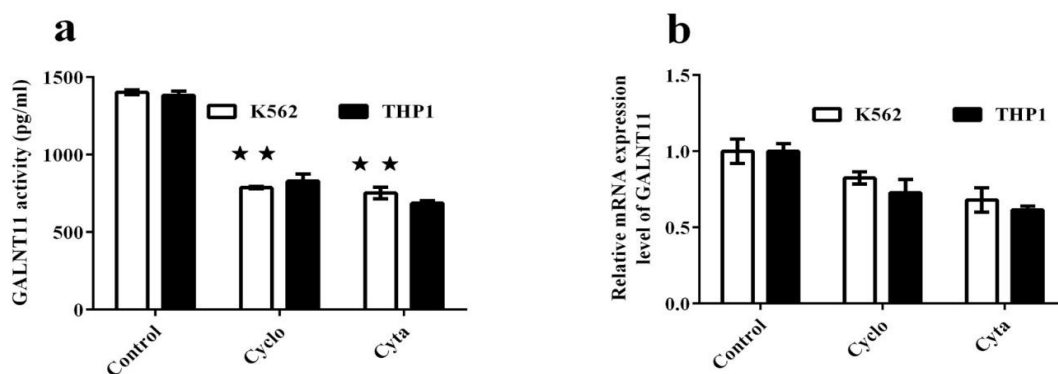
تصویر ۱: ارزیابی فعالیت و بیان ژن استیل گالاکتوز آمین ترانسفراز ۱۱ در لوسمی حاد و مزمن

الف: میزان فعالیت آنزیم N-استیل گالاکتوز آمین ترانسفراز ۱۱، در ۱۰ نمونه از بیماران AML، ۱۰ نمونه از بیماران CML، ۱۰ نمونه از افراد سالم (گروه کنترل) به روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت که بیانگر افزایش دو برابری فعالیت این آنزیم در بیماران مبتلا به لوسمی حاد و مزمن بود. ب- بررسی میزان بیان آنزیم N-استیل گالاکتوز آمین ترانسفراز ۱۱ در رده‌های سلولی K562 و THP1 بروش PCR نشان‌دهنده افزایش قابل توجه بیان این آنزیم در رده‌های سلولی لوسمی بود.



تصویر ۲: تاثیر سیکلوفسفامید و سیتارابین در توقف رشد سلولی در لوسمی

الف: بررسی سمیت داروی سیکلوفسفامید در رده‌های سلولی لوسمی انسانی به روش MTT انجام گرفت که با توجه به مقادیر IC_{50} : $34.73 \pm 0.12 \mu M$ و $36.16 \pm 0.23 \mu M$ برای سلول‌های K562 و THP1، بیانگر سمیت بالای این دارو در این رده‌های سلولی بود.
ب: سمیت داروی سیتارابین در رده‌های سلولی لوسمی انسانی به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت که مقادیر IC_{50} : $0.38 \pm 0.15 \mu M$ و $0.52 \pm 0.18 \mu M$ برای سلول‌های K562 و THP1 حاکی از سمیت قابل توجه این دارو بر سلول‌های سرطانی لوسمی انسانی بود.



تصویر ۳: تاثیر سیکلوفسفامید و سیتارابین در فعالیت و بیان ژن استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز ۱۱ در لوسمی

الف: به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی K562 و THP1 در حضور یک پنجم IC_{50} سیکلوفسفامید، میزان فعالیت آنزیم N استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز ۱۱ تا حدود دو برابر کاهش یافت.
ب: پس از تیمار سلول‌ها با یک پنجم IC_{50} سیکلوفسفامید و سیتارابین، بیان mRNA آنزیم استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز ۱۱ در سلول‌های THP1 و K562 به میزان قابل توجهی کاهش یافت.

بحث

اختلال در گلیکوزیلاسیون در سلول‌های سرطانی باشد، از طرفی بهره‌گیری از دو داروی سیکلوفسفامید و سیتارابین می‌تواند فعالیت و بیان آنزیم فوق را کاهش دهد.

طبق نتایج پژوهش Xia Ding و همکاران، افزایش بیان ppGalNAc T1 فاکتوری در تشخیص زود هنگام سرطان کیسه صفرا بشمار می‌رود. آنها معتقد بودند که میان گلیکوزیلاسیون و پرولیفراسیون تومور ارتباطی وجود دارد (۱۰). اهمیت ۱۱ GALNT در تشخیص لوسمی در تحقیقات گذشته بخوبی مستند است (۱۱).

۱۱ GALNT آنزیم مهمی در مسیر گلیکوزیلاسیون در AML و CML بشمار می‌رود و اخیراً مطالعات متعددی برای ارزیابی

در مطالعه حاضر که هدف آن بررسی آنزیم N استیل گالاکتوزآمین ترانسفراز ۱۱ در لوسمی و همچنین کاهش بیان و فعالیت آنزیم فوق در بیماران مبتلا به AML و CML و در رده‌های سلول‌های لوسمی K562 و THP1 با استفاده از داروهای شیمی درمانی بود، استفاده از دو داروی سیکلوفسفامید و سیتارابین منجر به کاهش بیان و فعالیت این آنزیم گردید. به علاوه فعالیت آنزیم ۱۱ GALNT در بیماران مبتلا به لوسمی در مقایسه با گروه کنترل، دو برابر شده و سمیت بالای داروهای سیکلوفسفامید و سیتارابین در سلول‌های سرطانی لوسمی انسانی نشان داده شد.

بررسی یافته‌های این تحقیق بیانگر این است که بیان و فعالیت آنزیم ۱۱ GALNT در لوسمی افزایش می‌یابد که می‌تواند به علت

نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، فعالیت و بیان آنزیم GALNT۱۱ در لوسمی حاد و مزمن افزایش می‌یابد که اهمیت این آنزیم را بعنوان یک مارکر احتمالی و بالقوه نشان می‌دهد. همچنین سیکلوفسفامید و بویژه سیتارابین منجر به کاهش فعالیت آنزیمی و بیان ژن GALNT۱۱ می‌گردند. این عمل جلوی گلیکوزیلاسیون و آغاز مسیر سیگنالینگ تومورزایی را می‌گیرد.

قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد (کد ۳۹۴) انجام شده در دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد. از کلیه همکارانی که مارا در انجام این تحقیق یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

ملاحظات اخلاقی

ندارد

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرنت ۹۴/۸۷ از طرف مرکز سلولهای بنیادی علوم پزشکی تبریز صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

بین مولفین و مراکز تحقیقاتی کار شده (کاربردی دارویی، سلولهای بنیادی) منافع مشترک وجود دارد.

مشارکت مؤلفان

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

ویژگی‌های مختلف این آنزیم صورت گرفته تا بصورت بالینی مورد استفاده قرارگیرد. شواهد نشان می‌دهند که در رستپورهای سطحی سلولهای توموری تغییراتی صورت می‌گیرد که بر سیستم ایمنی و محیط اطراف تومور تاثیر می‌گذارد. یکی از این تغییرات مهم که در بسیاری از سرطانها دیده می‌شود، گلیکوزیلاسیون می‌باشد. هرگونه افزایش یا کاهش در گلیکوزیلاسیون منجر به تغییرات رستپورهای غشایی و در نتیجه آغاز مسیر سیگنالینگ در سلولهای تومور خواهد شد.

Chen Wu و همکاران نیز یکی دیگر از اعضای این خانواده آنزیمی یعنی GALNT ۱۴ را بیومارکری تشخیصی در سرطان پستان معرفی نمودند (۱۲). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پس از انکوباسیون سلولهای سرطانی لوسمی انسانی با سیکلوفسفامید و سیتارابین، فعالیت و بیان GALNT۱۱ کاهش می‌یابد (تصویر ۳). در ارتباط با یافته‌های پژوهش حاضر، Ulrich Andergassen و همکاران، نشان دادند که گلیکوزیل ترانسفرازها بعنوان مارکری تشخیصی در مراحل اولیه تومورزایی مطرح می‌باشند (۱۳).

در سلولهای سرطانی لوسمی انسانی، تحقیقات محدودی در مورد GALNT۱۱ بعنوان بیومارکر انجام شده است. نتایج مطالعه‌ی ما که در *in vivo* و *in vitro* انجام گرفت نشان داد که در بیماران مبتلا به AML و CML، بیان و فعالیت GALNT۱۱ افزایش می‌یابد. همچنین فعالیت این آنزیم در رده‌های سلولی K۵۶۲ و THP۱ لوسمی، پس از انکوباسیون در حضور سیکلوفسفامید و سیتارابین کاهش چشمگیری داشت. این نتایج مشابه یافته‌های Libisch و همکاران (در زمینه‌ی لنفوسیت‌های CCL بود (۱۴).

Lina Song و همکاران معتقدند که مهارکننده‌های N استیل گالاکتوز آمین ترانسفراز، مانع تهاجم سلولهای سرطانی می‌شوند (۱۵). اطلاعات حاصل از این تحقیق GALNT۱۱ را بعنوان مارکری احتمالی و بالقوه در سرطانهای AML و CML پیشنهاد می‌کند. با توجه به محدودیت مطالعه‌ی حاضر در زمینه‌ی استفاده از حجم نمونه‌های بیشتر، مطالعات دیگری با جامعه‌ی مورد بررسی بیشتر در مورد قطعیت نقش تشخیصی GALNT۱۱ در بیماران مبتلا به سرطان می‌بایست انجام گیرد.

References

- Vidal A D, Thalmann G N, Karamitopoulou-Diamantis E, Fey M F, Studer U E, et al. Long-term outcome of patients with clinical stage I high-risk nonseminomatous germ-cell tumors 15 years after one adjuvant cycle of bleomycin, etoposide, and cisplatin chemotherapy. *Annals of Oncology* 2014; 26(2): 374-377. doi:10.1093/annonc/mdu518
- Grant S R, Walker G V, Ashleigh Guadagnolo B, Koshy M, Allen P K, Mahmood U, et al. Variation in insurance status by patient demographics and tumor site among nonelderly adult patients with cancer. *Cancer* 2015; 121(12): 2020-2028. doi: 10.1002/cncr.29120
- Chinen A B, Guan Ch M, Ferrer J R, Barnaby S N, Merkel T J, Mirkin Ch A, et al. Nanoparticle probes

- for the detection of cancer biomarkers, cells, and tissues by fluorescence. *Chemical reviews* 2015; **115**(19): 10530-10574. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00321
4. Wang D G, Chen G, Wen XY, Wang D, Cheng ZH, Sun SQ, et al. Identification of biomarkers for diagnosis of gastric cancer by bioinformatics. *Asian Pac J Cancer Prev (APJCP)* 2015; **16**(4): 1361-1365. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.4.1361
5. Nana-Sinkam S, Croce C. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2013; **93**(1): 98-104. doi: 10.1038/clpt.2012.192
6. Piwkhram D. Mutation screening and association study of the Folylpolyglutamate Synthetase (FPGS) gene with susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 2015; **16**(11): 4727-4732. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.11.4727
7. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013; **27**(5): 1100-1106. doi: 10.1038/leu.2012.357
8. Winkelmann N, Rose-Zerilli M, Forster J, Parry M, Parker A, Gardiner A, et al. Low frequency mutations independently predict poor treatment-free survival in early stage chronic lymphocytic leukemia and monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica* 2015; **100**(6): 237-239. doi: 10.3324/haematol.2014.120238
9. Glavey S V, Huynh D, Reagan M R, Manier S, Moschetta M, Kawano Y, et al. The cancer glycome: carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Reviews* 2015; **29**(4): 269-279. doi: 10.1016/j.blre.2015.01.003
10. Ding M X, Wang H F, Wang J S, Zhan H, Zuo Yi-Gang, De-Lin Yang, et al. ppGalNAc T1 as a potential novel marker for human bladder cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012; **13**(11): 5653-5657. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.11.5653
11. Stowell S R, Ju T, Cummings R D. Protein glycosylation in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2015; **10**: 473-510. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040438
12. Wu C1, Guo X, Wang W, Wang Y, Shan Y, Zhang B, et al., N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. *BMC Cancer* 2010; **10**(1): 123. doi: 10.1186/1471-2407-10-123
13. Andergassen U, Liesche F, Kölb A C, Ilmer M, Hutter S, Friese K, et al. Glycosyltransferases as markers for early tumorigenesis. *BioMed research international* 2015; **2015**: 792672. doi: 10.1155/2015/792672
14. Libisch M G, Casás M, Chiribao M, Moreno P, Cayota A, Osinaga E, et al. GALNT11 as a new molecular marker in chronic lymphocytic leukemia. *Gene* 2014; **533**(1): 270-279. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.052
15. Song L, Linstedt A. Inhibitor of ppGalNAc-T3-mediated O-glycosylation blocks cancer cell invasiveness and lowers FGF23 levels. *Elife* 2017; **31**(6): e24051. doi: 10.7554/eLife.24051

The acute effects of anaerobic exercise in the morning and evening on brain natriuretic peptide (BNP) in women with the Metabolic Syndrome

Ali Osali 

Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Bonab, Bonab, Iran

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

Received: 20 July 2017 Accepted: 4 November 2017 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):31-37

Abstract

Background: Brain natriuretic peptide (BNP) in terms of pathological is an important indicator for evaluation and detection left ventricular systolic dysfunction. It seems that physical activity and circadian rhythms are effective on BNP concentration. The aim of this study was to investigate the acute effects of anaerobic exercise in the morning and evening on brain natriuretic peptide in women with Syndrome Metabolic.

Methods: 17 women 30-40 years of age with Metabolic Syndrome were selected voluntarily and purposefully participated in the study. Then in two separate sessions (within 6 days) anaerobic exercise performed in the morning and evening. Blood samples were collected before and immediately after exercise in the morning and evening.

Results: The BNP concentrations significantly increased after exercise in the morning and evening ($P < 0.000$). There was significant difference between morning and evening in BNP concentration after exercise ($P < 0.002$).

Conclusion: Considering the significant difference in the mean BNP concentration in the morning and evening, due to the lower average of BNP concentration in the evening it seems activity in the evening have less stress on the myocardial wall.

Keyword: Brain natriuretic peptide, anaerobic exercise, Syndrome Metabolic.

How to cite this article: Osali A. [The acute effects of anaerobic exercise in the morning and evening on brain natriuretic peptide in women with the Metabolic Syndrome]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):31-37. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر حاد فعالیت بی هوازی در صبح و عصر بر غلظت BNP زنان مبتلا به سندرم متابولیک

علی اوصالی^{ID}

دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه بناب، بناب، ایران
* نویسنده مسئول؛ ایمیل: osalialiphd@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۳۷-۳۱

چکیده

زمینه: پپتید ناتریورتیک مغزی (BNP) به لحاظ پاتولوژیک یک نشانگر مهم در بررسی و تشخیص اختلال عملکرد سیستمیک بطن چپ می باشد. به نظر می رسد فعالیت بدنی و ساعات شبانه روزی بر تغییرات غلظت BNP اثرگذار است. هدف از مطالعه حاضر بررسی زمان انجام فعالیت بی هوازی بر تغییرات غلظت BNP زنان مبتلا به سندرم متابولیک بود.

روش کار: ۱۷ زن ۳۰ تا ۴۰ ساله مبتلا به سندرم متابولیک به صورت داوطلبانه و هدفمند انتخاب و در مطالعه شرکت کردند. سپس در دو جلسه ی مجزا (به فاصله ۶ روز) فعالیت بی هوازی را در صبح و عصر و به صورت میدانی اجرا کردند. نمونه ی خونی قبل و بلافاصله بعد از اجرای فعالیت در صبح و عصر جمع آوری گردید. برای تجزیه تحلیل داده ها از روش آماری تی تست و تی جفتی استفاده گردید. سطح معنی داری ($P \leq 0.05$) در نظر گرفته شد. **یافته ها:** بر اساس نتایج بدست آمده تفاوت معنی داری در تغییرات BNP صبح و عصر در پیش آزمون و پس آزمون وجود داشت ($P < 0.000$). همچنین غلظت BNP بعد از تمرین هوازی در وهله صبح نسبت به عصر بیشتر بود و این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار می باشد ($P < 0.002$). **نتیجه گیری:** باتوجه به وجود تفاوت معنی دار در میانگین غلظت BNP صبح و عصر، به دلیل کمتر بودن میانگین غلظت BNP در عصر به نظر می رسد فعالیت در عصر استرس کمتری را بر دیواره میوکارد وارد می کند.

کلید واژه ها: پپتید ناتریورتیک مغزی، فعالیت بی هوازی، سندرم متابولیک

نحوه استناد به این مقاله: اوصالی ع. تأثیر حاد فعالیت بی هوازی در صبح و عصر بر غلظت BNP زنان مبتلا به سندرم متابولیک. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۳۷-۳۱

حق تألیف برای مؤلف محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی رایت 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

با کشف پپتیدهای ناتریوریتیک، دانش سستی مردم از قلب تغییر کرد و مفهوم جدیدی مطرح گردید که قلب تنها یک عضو پویا برای گردش خون نیست، بلکه عملکرد اندوکراین مهمی دارد. پپتید ناتریوریتیک مغزی یا پپتید ناتریوریتیک نوع B (BNP) در سال ۱۹۸۸ کشف شد و پپتید ناتریوریتیک مغزی نام گرفت، چرا که برای اولین بار در مغز خوک شناسایی گردید (۱)، پس از آن BNP در غلظت‌های بسیار بیشتر در بافت‌های قلبی یافت شد (۲). BNP اصولاً توسط کاردیومیوسیت‌های بطنی ستر و ترشح می‌شود (۲). افزایش تنش یا کشش دیواره بطن در نتیجه اضافه‌بار حجمی می‌تواند ترشح BNP از بطن چپ را تحریک نماید (۲، ۳). به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی می‌تواند غلظت سرمی این پپتید را تحت تأثیر قرار دهد (۴-۶). BNP به لحاظ پاتولوژیک یک نشانگر مهم در بررسی و تشخیص اختلال عملکرد سیستمی بطن چپ می‌باشد (۶، ۷).

BNP جزء هورمون‌های پلی پپتیدی قلب و وازودیلاتورهای بسیار نیرومند به شمار می‌رود. ناتریوریزس فرایند دفع مقادیر نمک در ادرار است. BNP غلظت سدیم در خون را از راه دفع ادراری کاهش می‌دهد به همراه دفع سدیم مقدار زیادی نیز آب دفع می‌گردد. بسیاری از داروهای دیورتیک با استفاده از این مکانیسم فشار خون را کاهش می‌دهند. در حقیقت پپتیدهای ناتریوریتیک دیورتیک‌های طبیعی بدن خوانده می‌شوند که از راه قلب و رگ‌های خونی در هنگام بروز نارسایی قلبی ترشح می‌شوند. نیمه عمر BNP بیست دقیقه است (۱، ۸).

BNP نوروهورمونی است که در اثر فشار به دیواره‌ها و اتساع بطن‌های قلب و همچنین افزایش فشار خون آزاد می‌شود. BNP کاهش فشار خون را از طریق اتساع و انقباض شریان‌های آوران و ابران گلوبومرولی باعث می‌گردد. همچنین BNP با مهار کاتکولامین‌ها و افزایش گیرنده غشایی cGMP باعث شل شدن عضلات صاف رگی در شریان‌ها و وریدها می‌شوند (۱).

انجام تمرینات ورزشی مداوم و اتخاذ رژیم غذایی موجب کاهش سطح BNP می‌گردد (۸). نتایج غالب تحقیقات انجام گرفته شده افزایش سطوح BNP در حین و بلافاصله و ۳۰ دقیقه بعد از یک جلسه تمرین ورزشی را نشان می‌دهند (۱، ۵، ۶، ۹، ۱۰). نوع تمرینات و زمان انجام تمرینات جهت کاهش فشار و خطرات احتمالی به قلب مورد توجه فیزیولوژیست‌های ورزشی است (۶). امروزه اشکال جدید و متنوعی از تمرینات ورزشی در حال توسعه هستند و به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند. به طور سستی، تمرینات تداومی با شدت متوسط روش تمرینی ترجیحی در دستیابی به تغییرات عملکردی، توان‌بخشی و پیشگیری از بیماری‌ها بوده است (۶، ۸). از طرفی تمرینات تناوبی با شدت بالا برای مدت‌هاست که توسط ورزشکاران نخبه به کار

گرفته می‌شود، اما به عنوان یک روش تمرینی مؤثر همانند تمرینات سستی، کمتر در جوامع علمی جهت درمان و پیشگیری مورد توجه قرار گرفته است (۱۱). در دهه‌های اخیر علاقه‌مندی به تمرینات تناوبی با شدت بالا افزایش یافته است (۵). این افزایش علاقه‌مندی می‌تواند در نتیجه یافته‌های برخی از مطالعات باشد که نشان داده‌اند، تمرین تناوبی که از چندین وهله فعالیت با شدت بالا همراه با وهله‌های استراحتی تشکیل شده است می‌تواند اثراتی بارزتر و یا مشابه با تمرین تداومی سستی بر سازگاری‌های قلبی تنفسی و عملکرد قلبی عروقی داشته باشد (۵، ۱۲). همچنین با وجود فواید سلامتی بالقوه و زیاد تمرینات استقامتی، بسیاری از بزرگسالان به علت نداشتن زمان کافی به عنوان یک مانع مهم در این تمرین‌ها شرکت نمی‌کنند. بنابراین مطالعه‌ی یک برنامه‌ی فعالیت ورزشی جایگزین با سازگاری‌های متابولیک مشابه و بدون تعهد زمانی قابل ملاحظه مورد نیاز می‌باشد. یکی از این پروتکل‌ها و فعالیت‌های ورزشی که به تازگی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته، تمرینات ایتروال است که شامل تناوب‌های فعالیت ورزشی معمولاً با شدت زیاد و وهله‌های استراحتی می‌باشد. این تمرینات یک مدل بسیار کارآمد زمانی تمرین ورزشی بوده و بسیاری از سازگاری‌های متابولیکی تمرین استقامتی را دارد (۱۳).

سندرم متابولیک به حضور حداقل ۳ از ۵ عامل خطر متابولیک اطلاق می‌شود که این عوامل عبارتند از: چربی دور کمر بیشتر از ۹۴ سانتی متر، تری گلیسیرید بالاتر از ۱۵۰، سطح HDL-C کمتر از ۴۰، هاپرگلیسمی (گلوکز بیشتر از ۱۱۰) و فشار خون بالاتر از ۱۳۰/۸۵ (۱۴، ۱۵). در این میان یکی از بهترین متد پیشنهادی از سوی فیزیولوژیست‌های ورزشی جهت بهبود سندرم متابولیک تمرین تناوبی با شدت بالا می‌باشد. با توجه به اینکه فشار خون بالا موجب پس بار می‌شود این نگرانی برای فیزیولوژیست‌های ورزشی وجود دارد که انجام تمرین با شدت بالا و پس بار حاصل از فشار خون بالا موجب افزایش BNP گردد (۱۶).

ریتم شبانه‌روزی، عمل سلول‌ها و هورمون‌های بدن را در طی یک دوره ۲۴ ساعته در طول زندگی تنظیم می‌کند. سطح هورمون‌های بدن در طول شبانه‌روز در نوسان است؛ از این رو بررسی تأثیر ریتم شبانه‌روزی بر سطوح هورمون‌ها همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است (۱۷، ۱۸). یافته‌های اخیر علم زیست‌شناسی زمانی (شناخت اثر زمان بر تغییرات فیزیولوژیک) نشان می‌دهد، بدن انسان در طول شبانه‌روز متحمل تغییرات زیادی می‌شود و در هر ساعت توانایی خاصی دارد (۱۹، ۲۰). به نظر می‌رسد ساعات شبانه‌روزی بر تغییرات غلظت BNP اثرگذار است (۱۸). بنابراین هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی بهترین زمان برای انجام فعالیت تناوبی با شدت بالا بر تغییرات غلظت BNP زنان

جداسازی پلاسما نمونه‌ها تا زمان تجزیه تحلیل در دمای ۷۰- درجه فریز شدند. غلظت BNP بوسله رادیوایمونواسی توسط کیت Shionoria RIA kit اندازه‌گیری شد. از میانگین و انحراف معیار برای توصیف آماری داده‌ها استفاده شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با به کار گیری آزمون شاپیرو-ویلک مورد بررسی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل استنباطی از آزمون t جفتی برای مقایسه میانگین پیش‌آزمون و پس‌آزمون استفاده شد. همچنین از آزمون تی وابسته جهت بررسی اختلاف میانگین BNP پس از تمرین صبح و عصر استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ = α در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های فردی آزمودنی‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد و نتایج این آزمون نشان داد که همه داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار بودند. بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌داری تغییرات BNP در دو نوبت صبح و عصر در پیش‌آزمون و پس‌آزمون در مقادیر غلظت BNP وجود داشت (۰/۰۵ < P) (جدول ۲). غلظت BNP پس از فعالیت در صبح و عصر نسبت به پیش‌آزمون افزایش معنی‌داری پیدا کرد (۰/۰۵ < P) (جدول ۳).

جدول ۱: ویژگی‌های فردی آزمودنی‌ها (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

متغیر	میانگین $\pm$ انحراف معیار
سن (سال)	۳۵/۱۷ $\pm$ ۳/۱۴
فشار خون	۱۴۷/۸۸ $\pm$ ۱۰/۶۲
سایز دور کمر (cm)	۱۰۲/۹۴ $\pm$ ۶/۴۱
چربی بدن (درصد)	۳۷/۲۹ $\pm$ ۳/۳۷

جدول ۲: تغییرات BNP در دو نوبت صبح و عصر توسط آزمون تی جفتی

متغیر	اندازه‌گیری	زمان فعالیت	
		صبح	عصر
BNP (pg/mL)	پیش‌آزمون	۲۴/۸۸ $\pm$ ۲/۵۴	۲۴/۴۲ $\pm$ ۲/۹۶
	پس‌آزمون	۳۶/۵۸ $\pm$ ۴/۳۸	۳۱/۱۰ $\pm$ ۵/۵۱

*: نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین پیش‌آزمون و پس‌آزمون

جدول ۳: مقایسه میزان اختلاف BNP پیش‌آزمون و پس‌آزمون در دو نوبت صبح و عصر توسط آزمون تی تست

متغیر	اختلاف پیش و پس از آزمون (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	
	صبح	عصر
BNP (pg/mL)	۱۱/۷۰ $\pm$ ۴/۸۹	۶/۶۸ $\pm$ ۳/۸۷

مبتلا به سندرم متابولیک می‌باشد. در این تحقیق در نظر داریم میزان سطوح BNP بلافاصله بعد از تمرین صبح و عصر را در زنان مبتلا به سندرم متابولیک را مورد بررسی قرار دهیم. با انجام این تحقیق بهترین زمان برای انجام تمرینات ورزشی افراد مبتلا به سندرم متابولیک مشخص خواهد شد.

روش کار

۱۷ زن ۳۰ تا ۴۰ ساله مبتلا به سندرم متابولیک با میانگین سنی ۳۵/۱۷ $\pm$ ۳/۱۴ سال به صورت داوطلبانه و هدفمند انتخاب و در این مطالعه شرکت کردند. طرح تحقیق مطالعه‌ی حاضر، طرح پیش‌آزمون-پس‌آزمون با یک گروه و اندازه‌گیری در زمان‌های مختلف بود. در ابتدای مطالعه آزمودنی‌ها از اهداف و خطرات احتمالی تحقیق آگاه شدند و از آن‌ها خواسته شد تا فرم رضایت آگاهانه و همچنین پرسشنامه‌ی سابقه‌ی پزشکی شرکت در طرح پژوهشی را با دقت مطالعه و تکمیل نمایند. هیچ‌یک از آزمودنی‌ها دارای سابقه بیماری ریوی، کلیوی یا قلبی-عروقی نبودند و مشروبات الکلی و سیگار استعمال نمی‌کردند. در جلسه‌ی مجزا قد و وزن آزمودنی‌ها با استفاده از ترازو و قدسنج اندازه‌گیری شد. همچنین ترکیب بدنی شرکت‌کنندگان با استفاده از دستگاه بادی کامپوزیشن مدل BF500 OMRON ساخت کشور آلمان اندازه‌گیری گردید میزان خطای این دستگاه ۰/۱ می‌باشد. سپس آزمودنی‌ها با نحوه اجرای پروتکل فعالیت ورزشی آشنا شدند. آزمودنی‌ها فعالیت تناوبی با شدت بالا را صبح ساعت (۷:۳۰) الی (۸:۳۰) و پس از ۶ روز دوره‌ی پاکسازی عصر ساعت (۱۷:۳۰) الی (۱۸:۳۰) اجرا کردند.

فعالیت تناوبی با شدت بالا شامل اجرای پروتکل تمرینی اصلاح شده بروس بود (۶). آزمودنی‌ها در وهله اول ۵ مرحله از تست بروس را انجام دادند. آزمودنی‌ها در وهله‌های دوم تا هفتم فقط مرحله ۵ تست بروس که سرعت دویدن ۶/۷۶ و شیب آن ۱۶٪ بود را انجام دادند. آزمودنی‌های ۱۲۰ ثانیه استراحت غیرفعال در بین وهله‌ها را در دستور کار داشتند.

فشارخون آزمودنی‌ها در حالت نشسته بر روی صندلی با پشتی مناسب به طوری که هر دو پا بر روی زمین قرار داشت به وسیله دستگاه فشارسنج بازویی دیجیتال (Omron M2, Kyoto, Japan) بر طبق راهنمای سازمان جهانی بهداشت (۲۱)، قبل و بلافاصله بعد از اجرای فعالیت اندازه‌گیری شد.

نمونه خونی نیز قبل و بلافاصله بعد (حداکثر ۵ دقیقه بعد از فعالیت) از فعالیت از ساعد افراد و در حالت نشسته با استفاده از سرنگ استریل و توسط تکنسین آزمایشگاه در محل اجرای آزمون در لوله آزمایش پلی پروپیلن جمع‌آوری گردید. نمونه‌های خون در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در آزمایشگاه پارس زنجان سانتریفیوژ شدند. پس از

بحث

غلظت BNP پس از فعالیت در صبح ۴۷٪ و عصر ۲۷/۳۵٪ نسبت به پیش آزمون افزایش پیدا کردند که این افزایش از لحاظ آماری معنی دار می باشد. همچنین نتایج آزمون تی مستقل نشان از تفاوت معنی داری بین اختلاف میانگین پیش آزمون و پس آزمون غلظت BNP در صبح و عصر بود. میانگین غلظت BNP پس از تمرین در صبح نسبت به عصر ۱۵٪ بیشتر بود. تقریباً تمام فرایندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بدن انسان از ریتم شبانه روزی پیروی می کنند (۲۲). Ohno و همکاران در مطالعه ای بر روی نمونه های حیوانی مشاهده کردند که میانگین غلظت BNP در ساعت ۲:۳۰ بامداد کمترین غلظت و در ساعت ۱۴:۳۰ بیشترین غلظت را داشت. بر اساس این یافته به نظر می رسد غلظت BNP تا حدودی تحت تأثیر ریتم شبانه روزی قرار دارد (۱۸). همچنین لازم بذکر است میانگین غلظت BNP در افراد مبتلا به قلبی عروقی بیشتر از افراد سالم می باشد (۲۳).

انگوارن و همکاران، Normandin و همکاران، Tanabe و همکاران، Kruger و همکاران و Löwbeer و همکاران در مطالعه خود عدم تغییر معنی دار BNP را پس از فعالیت ورزشی گزارش کردند که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر ناهمسو می باشد (۲۳، ۲۵). به طور مثال، Normandin و همکاران تغییر معنی داری را در غلظت BNP به واسطه فعالیت دوچرخه سواری با ۶۰ درصد از حداکثر توان به مدت ۲۲ دقیقه در بیماران با نارسایی قلبی ۶۱ ساله مشاهده نکردند (۲۳). همچنین Tanabe و همکاران در تحقیق خود عدم تغییر معنی دار غلظت BNP در افراد سالم ۲۲ ساله بعد از فعالیت با دوچرخه کارسنج را گزارش کردند، آزمودنی ها در این تحقیق پس از ۴ دقیقه گرم کردن با شدت ۲۰ وات، تا آستانه بی هوازی که هر سه ثانیه یک وات به شدت دوچرخه سواری افزوده می شد تمرین کردند (۳). با این حال چندین مطالعه افزایش در BNP را پس از فعالیت ورزشی گزارش کرده اند (۴، ۶، ۲۶، ۲۷). شیخانی و همکاران در تحقیقی اثر یک جلسه تمرین مقاومتی و هوازی را در ورزشکاران حرفه ای را بررسی کردند. یافته های آنها حاکی از افزایش معنی دار غلظت BNP پلاسما بلافاصله پس از رقابت فوتبال، والیبال، شنا و بدنسازی بود (۲۷). نتایج مطالعه ای انگلن و همکاران که بر روی افراد سالم و بیماران با فیبریلاسیون دهلیزی انجام شده بود نیز نشان داد که BNP به طور معنی داری در طی فعالیت بروس اصلاح شده و اوج آزمون ورزشی در تمامی آزمودنی ها افزایش داشت (۶). Opolski و Wozakowska تغییرات BNP را پس از آزمون بروس اصلاح شده در بیماران با فیبریلاسیون دهلیزی مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که غلظت BNP بلافاصله پس از فعالیت افزایش معنی داری یافت (۴). علاوه بر این مطالعات، کروپیکا و همکاران نیز تغییرات BNP پلاسما را در ۱۵ مرد سالم و به طور تفریحی دارای سابقه ورزشی

قبل، بلافاصله بعد و یک تا سه ساعت بعد از تست بیشینه بر روی دوچرخه کارسنج بررسی کردند. یافته های آنها نشان داد که افزایش در BNP تنها بلافاصله بعد از فعالیت بیشینه در مقایسه با مقادیر پیش آزمون معنی دار بود. افزایش در غلظت BNP در مردان ورزشکار پس از ۱۰۰ کیلومتر دوی فوق مارتن نیز گزارش شده است (۲۸). احتمالاً تفاوت در نوع تمرین (۳، ۵، ۶، ۲۳)، شدت فعالیت (۳، ۲۳، ۲۸)، مدت فعالیت (۶، ۲۳، ۲۸) و ویژگی های آزمودنی (۳، ۴، ۲۷) علت ناهمسانی در نتیجه مطالعه حاضر با مطالعات یاد شده باشد. نکته قابل توجه این می باشد که انجام تمرینات ورزشی با حداکثر توان و یا استقامتی طولانی مدت موجب افزایش BNP گردیده است. با توجه به اینکه تاکنون هیچ تحقیقی میزان تغییرات BNP را در صبح و بعد از ظهر پس از تمرین بی هوازی در زنان مبتلا به سندرم متابولیک مورد بررسی قرار نداده است امکان مقایسه نتایج مشابه و مخالف در این زمینه وجود ندارد.

سنجش BNP به عنوان نشانگر و پیش بینی کننده مستقل بقای قلبی در تشخیص و پیش بینی اختلال عملکرد، ایسکمی و نارسایی قلبی استفاده می شود (۲۹). BNP توسط کاردیومیوسیت های بطنی ستر و ترشح می شود (۲، ۴، ۳۰). افزایش تنش یا کشش دیواره بطن در اثر اضافه بار حجمی و ایسکمی می تواند موجب تحریک و ترشح BNP از بطن چپ شود (۲). در افراد سالم نیز افزایش فشار و اضافه بار بطن چپ می تواند عاملی مهم در رهایش BNP باشد (۲، ۳). اگر پس از فعالیت ورزشی آسیب در میوکارد هر چند ناچیز رخ دهد، میزان BNP افزایش می یابد (۲، ۲۸). از این رو، از آنجایی که افزایش غلظت BNP در خون بازتابی از افزایش تنش دیواره میوکارد به علت کشش و آسیب کاردیومیوسیت ناشی از اضافه بار حجم یا فشار می باشد، به نظر می رسد که فعالیت تناوبی با حجم کم و شدت بالا در مطالعه حاضر موجب اضافه بار یا فشار بر بطن چپ و ایجاد اختلال در عملکرد بطنی در زنان مبتلا به سندرم متابولیک غیر فعال شده باشد و از آنجایی که این مقدار در عصر کمتر از صبح بود انجام تمرین در عصر را به زنان مبتلا به سندرم متابولیک را پیشنهاد می کنیم.

نتیجه گیری

به دلیل کمتر بودن میانگین غلظت BNP زنان مبتلا به سندرم متابولیک پس از فعالیت تناوبی بی هوازی در عصر نسبت به صبح، به نظر می رسد فعالیت در عصر استرس کمتری را بر دیواره میوکارد وارد کرده و انجام فعالیت ورزشی در عصر می تواند مناسب تر باشد.

قدردانی

از کلیه‌ی آزمودنی‌ها که در این پژوهش شرکت کردند و همچنین از مسئولان محترم توانبخشی ایثار زنجان به جهت همکاری در نمونه‌گیری و اجرای پژوهش و تمامی افرادی که ما را در این امر یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌نمایم.

تعارض منافع

تمام هزینه‌های این تحقیق برعهده نویسنده بود و هیچ گونه تعارض منفعی وجود نداشت.
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 برعهده نویسنده بوده است.

منافع متقابل

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

مشارکت مؤلفان

۱. ع. ا. طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته، همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است.

References

1. Hafeezullah Wazir A, Muhammad A, Muhammad Mazhar H, Sohail A, Farmanullah W. Effect of endurance exercise on brain natriuretic peptide. *KMUJ* 2013; 5(2): 66-70.
2. Kruger S, Graf J, Kunz D, Stickel T, Hanrath P, Janssens U. Brain Natriuretic Peptide Levels Predict Functional Capacity in Patients With Chronic Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 40(4): 718-722. doi: 10.1016/S0735-1097(02)02032-6
3. Tanabe K, Yamamoto A, Suzuki N, Akashi Y, Seki A, Samejima H, et al. Exercise-induced changes in plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide concentrations in healthy subjects with chronic sleep deprivation. *Japanese circulation journal* 1999; 63(6): 447-452. doi: 10.1253/jcj.63.447
4. Wozakowska-Kaplon B, Opolski G. Effects of exercise testing on natriuretic peptide secretion in patients with atrial fibrillation. *Kardiologia polska* 2009; 67(3): 254-261. doi: 10.1111/j.1540-8159.2010.02789.x
5. Krupicka J, Janota T, Kasalova Z, Hradec J. Effect of short-term maximal exercise on BNP plasma levels in healthy individuals. *Physiological Research* 2010; 59(4): 625.
6. Engelman M D, Niemann L, Kanstrup I-L, Skagen K, Godtfredsen J. Natriuretic peptide response to dynamic exercise in patients with atrial fibrillation. *International journal of cardiology* 2005; 105(1): 31-39. doi: 10.1016/j.ijcard.2004.10.046
7. McDonagh T, Robb S, Murdoch D, Morton J, Ford I, Morrison C, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *The Lancet* 1998; 351(9095): 9-13. doi: 10.1016/S0140-6736(97)03034-1
8. Hidetaka Hamasaki. The Effects of Exercise on Natriuretic Peptides in Individuals without Heart Failure. *MDPI* 2016; 4(2): 32. doi: 10.3390/sports4020032
9. Sheikhan Shahin H, Babaee Bigi M A, Aslani A, Daryanoosh F. Effect of Professional Exercises on Brain Natriuretic Peptide. *Iranian Cardiovascular Research Journal* 2009; 3(4): 213-216.
10. Kato M, Kinugawa T, Ogino K, Endo A, Osaki S, Igawa O, et al. Augmented response in plasma brain natriuretic peptide to dynamic exercise in patients with left ventricular dysfunction and congestive heart failure. *Journal of Internal Medicine* 2000; 248: 309-315. doi: 10.1046/j.1365-2796.2000.00736.x
11. Dunham C, Harms C A. Effects of high-intensity interval training on pulmonary function. *European journal of applied physiology* 2012; 112(8): 3061-3068. doi: 10.1007/s00421-011-2285-5.
12. Molmen-Hansen H E, Stolen T, Tjonna A E, Aamot I L, Ekeberg I S, Tyldum G A, et al. Aerobic interval training reduces blood pressure and improves myocardial function in hypertensive patients. *European journal of preventive cardiology* 2012; 19(2): 151-160. doi: 10.1177/1741826711400512
13. Jellayman C, Yates T, O'Donovan G, Gray L J, King J A, Khunti K, et al. The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: a meta-analysis. *Obesity Reviews* 2015; 16(11): 942-961. doi: 10.1111/obr.12317.
14. Grundy S M, Cleeman J I, Daniels S R, Donato K A, Eckel R H, Franklin B A, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American heart association/national heart, lung, and blood institute scientific statement. *Circulation* 2005; 112: 2735-2752. doi: 10.1161/circulationaha.105.169404
15. Cavalieri M, Ropele S, Petrovic K, Pluta-Fuerst A, Homayoon N, Enzinger C, et al. Metabolic syndrome, brain magnetic resonance imaging, and cognition. *Diabetes Care* 2010; 33(12): 2489-2495. doi: 10.2337/dc10-0851

16. Scharhag J, George K, Shave R, Urhausen A, Kindermann W. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. *Medicine+ Science in Sports+ Exercise* 2008; **40**(8): 1408. doi: 10.1249/MSS.0b013e318172cf22.
17. Viru Atko A, Viru Mehis. Biochemical monitoring of sport training. *Human Kinetics* 2001; **4**: 25-32.
18. Ohno R, Miyata H, Kimura M. Circadian R. Effects of anesthesia on plasma natriuretic peptide levels in rats. *Yakugaku zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2009; **129**(12): 1529-1535. doi: 10.1248/yakushi.129.1529
19. Filadelfi A, Caliman M, Lauro C. Comparative aspects of the pineal/melatonin system of poikilothermic vertebrates. *Journal of Pineal research* 1996; **20**(4): 175-186. doi: 10.1111/j.1600-079X.1996.tb00256.x
20. Goda A, Ohgi S, Kinpara K, Shigemori K, Fukuda K, Schneider E B. Changes in serum BDNF levels associated with moderate-intensity exercise in healthy young Japanese men. *Springerplus* 2013; **2**: 678. doi: 10.1186/2193-1801-2-678
21. Knoepfli-Lenzin C, Sennhauser C, Toigo M, Boutellier U, Bangsbo Jens, Krstrup Peter, et al. Effects of a 12-week intervention period with football and running for habitually active men with mild. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 2010; **10**(1): 72-79. doi: 10.1111/j.1600-0838.2009.01089.x
22. Teo W, Newton M J, McGuigan M R. Circadian rhythms in exercise performance: implications for hormonal and muscular adaptation. *J Sports Sci Med* 2011; **10**(4): 600-606. doi: 10.4135/9781412961165.n109
23. Normandin Eve, Nigam A, Meyer Ph, Juneau M, Guiraud T, Bosquet L, et al. Acute responses to intermittent and continuous exercise in heart failure patients. *Canadian Journal of Cardiology* 2012; **29**(4): 466-471. doi: 10.1016/j.cjca.2012.07.001
24. Löwbeer Ch, Seeberger A, Gustafsson S A, Bouvier F, Hulting J. Serum cardiac troponin T, troponin I, plasma BNP and left ventricular mass index in professional football players. *Journal of Science and Medicine in Sport* 2007; **10**(5): 291-296. doi: 10.1016/j.jsams.2006.10.002
25. Kruger S, Graf J, Merx M W, Stickel T, Kunz D, Hanrath P, et al. Brain natriuretic peptide kinetics during dynamic exercise in patients with chronic heart failure. *International journal of cardiology* 2004; **95**(1): 49-54. doi: 10.1016/j.ijcard.2003.04.021
26. Krupicka J, Janota T, Kasalova Z, Hradec J. Effect of Short-Term Maximal Exercise on BNP Plasma Levels in Healthy Individuals. *Physiol Res* 2010; **59**(4): 625-628.
27. Sheikhan H, Beygi M, Babaee A, Daryanoosh F, Jafari B. Alteration of Plasma Brain Natriuretic Peptide Level After Acute Moderate Exercise in Professional Athletes. *International Cardiovascular Research Journal* 2011; **5**(4): 148-150. doi: 10.5812/icrj.4648.
28. Ohba H, Takada H, Musha H, Nagashima J, Mori N, Awaya T, et al. Effects of prolonged strenuous exercise on plasma levels of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in healthy men. *American heart journal* 2001; **141**(5): 751-758. doi: 10.1067/mhj.2001.114371
29. de Groote P, Dagorn J, Soudan B, Lamblin N, McFadden E, Bauters C. B-type natriuretic peptide and peak exercise oxygen consumption provide independent information for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; **43**(9): 1584-1589. doi: 10.1016/j.jacc.2003.11.059
30. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991; **87**(4): 1402-1412. doi: 10.1172/JCI115146.

Study of rs2858060 polymorphism in Lnc-Ang362 long non-coding sequence as an informative marker in screening of atherosclerotic coronary artery diseases: pilot study

Khadijeh Bazooei¹, Mahboobeh Nasiri^{1*}, Hajar Kamfiroozi²

¹Department of Biology, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran

²Cardiologist, Cardiovascular Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*Corresponding author; E-mail: nasiri@iaua.ac.ir

Received: 26 May 2018 Accepted: 24 June 2018 First Published online: 4 July 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):38-43

Abstract

Background: Atherosclerotic coronary artery disease (CAD) is the major cause of death and disability by affecting more than 20% of the individuals over age 35. Lnc-Ang362, an AngII-upregulated long non-coding RNA transcript, regulates the vascular smooth muscle cell proliferation by targeting miR-221 and miR-222. The present study aimed to evaluate the association of the rs2858060 polymorphism in Lnc-Ang362 transcript with the risk of the atherosclerotic CAD.

Methods: This case-control study included 150 affected individuals with CAD and 149 healthy controls. T-ARMS PCR method was used to determine the genotypes of each sample for the polymorphic marker rs2858060 in Lnc-Ang362 gene.

Results: The frequency of the homozygote genotype CC in control group (42.3%) was higher than patient group (31.3%). Individuals with CC genotype were shown to have lower risk of CAD (OR: 0.61; 95%CI: 0.36- 1.01; $p=0.05$). The frequency of the polymorphic allele C was 0.51% in control group and 0.43% in patients (OR: 0.68; 95%CI: 0.49- 0.94; $p=0.02$).

Conclusion: The long non-coding RNA transcript Lnc-Ang362 may involve in the pathogenesis of the CAD and could consider as a molecular target for prognosis and screening of the patients with CAD.

Keyword: atherosclerotic coronary artery disease, screening, long non-coding transcript, Lnc-Ang362, rs2858060.

How to cite this article: Bazooei Kh, Nasiri M, Kamfiroozi H. [Study of rs2858060 polymorphism in Lnc-Ang362 long non-coding sequence as an informative marker in screening of atherosclerotic coronary artery diseases: pilot study]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August-September; 41(3):38-43. Persian.

مقاله پژوهشی

پلی مورفیسم rs2858060 در توالی غیرکدکننده طولیل Lnc-Ang362 به عنوان مارکر گویا در غربالگری بیماری‌های عروق کرونری آترواسکلروتیک: مطالعه آزمایشی

خدیجه بازویی^۱، محبوبه نصیری^{۱*}، هاجر کامفیروزی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران،
^۲ مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران،
نویسنده مسوول: ایمیل: nasiri@iaua.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۷/۳/۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱ (۳): ۳۸-۴۳

چکیده

زمینه: بیماری عروق کرونری آترواسکلروتیک (CAD) با درگیر کردن بیش از ۲۰٪ جمعیت بالای ۳۵ سال، یکی از علل عمده مرگ و ناتوانی محسوب می‌شود. Lnc-Ang362، رونوشت غیرکدکننده طولیل با افزایش بیان در پاسخ به آنژیوتانسین II، تکثیر سلول‌های ماهیچه صاف عروق را با هدف‌گذاری miR-221 و miR-222 تنظیم می‌کند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی ارتباط پلی مورفیسم rs2858060 در رونوشت Lnc-Ang362 با خطر بیماری CAD آترواسکلروتیک بود.

روش کار: این مطالعه مورد-شاهدی شامل ۱۵۰ فرد مبتلا به CAD و ۱۴۹ فرد کنترل سالم غیرمبتلا به CAD بود. روش T-ARMS PCR برای تعیین ژنوتیپ‌های هر نمونه برای مارکر پلی مورفیک rs2858060 در ژن Lnc-Ang362 استفاده شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت CC در گروه کنترل (۴۲/۳٪) بالاتر از گروه بیماران (۳۱/۳٪) بود. افراد با ژنوتیپ CC خطر کمتری برای CAD نشان دادند ($P=0/05$)، $OR: 0/61$ ، درصد، $95\%CI: 0/36-1/01$ ، $P=0/02$ ، $OR: 0/43$ ، درصد، $95\%CI: 0/20-0/94$ ، $P=0/02$ ، $OR: 0/68$ ، درصد، $95\%CI: 0/49-0/94$).

نتیجه‌گیری: پلی مورفیسم rs2858060 در ژن Lnc-Ang362 احتمالاً با خطر بروز بیماری عروق کرونری (CAD) ارتباط دارد.

کلید واژه‌ها: بیماری عروق کرونری آترواسکلروتیک، رونوشت غیرکدکننده طولیل، Lnc-Ang362، غربالگری، rs2858060

نحوه استناد به این مقاله: بازویی خ، نصیری م، کامفیروزی ه. پلی مورفیسم rs2858060 در توالی غیرکدکننده طولیل Lnc-Ang362 به عنوان مارکر گویا در غربالگری بیماری‌های عروق کرونری آترواسکلروتیک: مطالعه آزمایشی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱ (۳): ۳۸-۴۳

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

بیماری‌های قلبی-عروقی شایع‌ترین علت مرگ و میر در بیش‌تر کشورهای جهان و از جمله ایران می‌باشند. شایع‌ترین بیماری قلبی-عروقی ناهنجاری عروق کرونری است که عامل یک سوم تمام مرگ‌ها در افراد بالای ۳۵ سال می‌باشد (۱). توارث ناهنجاری‌های آترواسکلروتیک عروق کرونری (CAD) حاصل دخالت چندین ژن مجزا با سطح اثر متفاوت و عوامل محیطی متعدد می‌باشند (۲). شناسایی مستقیم ژن(های) بیماری‌زا در چنین بیماری‌هایی نیاز به صرف هزینه و زمان زیاد دارد. انجام مطالعات همراهی یک روش جای‌گزین سودمند در معرفی مارکرهای DNA مانند پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) برای غربال‌گری و تشخیص افراد در معرض خطر بیماری می‌باشد (۳). رونوشت‌های RNA غیرکدکننده طویل (طول بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید) فاقد اطلاعات لازم برای سنتز پروتئین هستند، اما به توالی مکمل خود در مولکول DNA یا RNA متصل شده و بیان ژن را تنظیم می‌کنند (۴). این رونوشت‌ها از اجزای بیولوژیک فعال در تنظیم الگوی بیان ژن، تنظیم مدیفیکاسیون‌های اپی‌ژنتیکی، تمایز، مسیر تکوین طبیعی موجود و تنظیم مسیرهای سیگنالینگ ضروری در حفظ سلامت ژنوم و ارگانیسم محسوب می‌شوند (۵). شواهد تجربی نشان داده است که lncRNAها در تکوین و پاتولوژی سیستم قلبی-عروقی نقش دارند. این شواهد توجه محققان زیادی را در سال‌های اخیر به سمت بررسی ارتباط واریانت‌های نوکلئوتیدی این رونوشت‌ها و مکانیسم عمل آنها در پاتوژنز بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله CAD جلب کرده است (۷، ۸). آنژیوتانسین II (AngII) یک هورمون پپتیدی است که تخریب عملکردهای آن می‌تواند منجر به آترواسکلروز و پرفشاری خون شود (۹). این هورمون با اثر مستقیم یا با تحریک تولید و آزادسازی نوراپی‌نفرین و همچنین با تولید اندوتلین ۱ در اندوتلیوم عروق موجب انقباض شدید رگ‌ها می‌شود (۱۰). رونوشت غیرکدکننده طویل Lnc-Ang362 که در مجاورت توالی دو miRNA شامل miR-221 و miR-222 قرار دارد، اولین مولکول پاسخ دهنده به AngII در مسیر تنظیمی این هورمون می‌باشد (۹). این دو miRNA فاقد مدیفیکاسیون‌های اپی‌ژنتیکی ضروری برای شروع رونویسی شامل تری‌متیلاسیون لیزین ۴ هیستون ۳ (H3K4m3) و H3K36m3 می‌باشند. با توجه به اینکه توالی Lnc-Ang362 دقیقاً در سمت ۵' این دو miRNA قرار گرفته است، بنظر می‌رسد بیان هر سه رونوشت از یک مسیر تنظیم می‌گردد. نتایج مطالعات تجربی نیز نشان داده است که بیان رونوشت Lnc-Ang362 و miR-221 و miR-222 به‌طور مشابهی در پاسخ به AngII در سلول‌های ماهیچه صاف عروق افزایش می‌یابد (۹). miR-221 و miR-222 دو تنظیم‌کننده مهم تکثیر سلولهای اندوتلیال هستند (۱۱).

با توجه به نقش AngII در بروز آترواسکلروز و اهمیت Lnc-Ang362 در مسیر سیگنالینگ این هورمون فرض گردید که هرگونه تغییر توالی که منجر به تغییر بیان یا عملکرد رونوشت Lnc-Ang362 شود می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های آترواسکلروتیک عروق کرونری نقش داشته باشد. پلی‌مورفیسم rs2858060 حاصل جانشینی نوکلئوتید گوانین (G) با سیتوزین (C) است که فراوانی آلل اجدادی G در جمعیت ۰/۴ برآورد شده است. شماره دسترسی این پلی‌مورفیسم -NR_029635.1.n. 1314C>G است (www.ncbi.nlm.nih.org). با توجه به جستجویی که در این زمینه انجام شده، اطلاعاتی در مورد نقش این پلی‌مورفیسم روی عملکرد و الگوی بیان ژن Lnc-Ang362 یافت نشد.

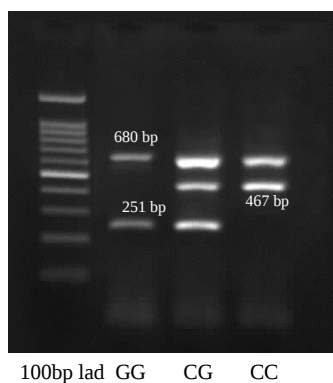
در بیماری‌های قلبی-عروقی مانند اکثر بیماری‌های دارای توارث پیچید، الگوی توارث بیماری نامشخص است و طراحی مطالعات آنالیز پیوستگی و همراهی دقیقی نیاز است تا بتوان مناطق ژنومی و واریانت‌های ژنتیکی دارای پیوستگی قوی با استعداد بروز بیماری را شناسایی کرد (۳). در این راستا، این مطالعه باهدف بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم rs2858060 در رونوشت Lnc-Ang362 با خطر بروز بیماری‌های عروق کرونری آترواسکلروتیک انجام شد.

روش کار

در این مطالعه مورد-شاهدی بر پایه بیمارستان که در فاصله زمانی سال‌های ۹۳ تا ۹۴ انجام گرفت، در ابتدا تمام افرادی که برای انجام آنژیوگرافی به بیمارستان خیریه قلب الزهراء شیراز مراجعه نموده بودند، برای تعیین معیارهای ورود به مطالعه مصاحبه شدند، که از میان آنها ۱۵۰ بیمار مبتلا به CAD که معیارهای لازم برای مطالعه حاضر را داشتند انتخاب و به مطالعه وارد شدند. افراد گروه کنترل را ۱۴۹ فرد سالم که از نظر جنس و سن (± 5) با بیماران همسان شده بودند تشکیل داد. نمونه خون افراد بیمار با همکاری متخصصین بخش آنژیوگرافی بیمارستان خیریه قلب الزهراء شیراز و نمونه خون افراد سالم از آزمایشگاه درمانگاه کیمیا جمع‌آوری گردید. ۵ سی‌سی نمونه خون محیطی از هر فرد در لوله استریل حاوی ماده ضدانعقاد EDTA ریخته شد و بلافاصله به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد بیمارستان منتقل شد. نمونه‌های خون روی یخ به آزمایشگاه ژنتیک منتقل گردید. تشخیص بیماری توسط متخصصین قلب و عروق و بدنبال انجام آنژیوگرافی و مشاهده آسیب‌های آترواسکلروتیک در عروق بیماران صورت گرفت. افرادی که سابقه بیماری دیابت، پرفشاری خون، هیپرکلسترولمی داشتند از مطالعه خارج شدند. در افراد گروه کنترل علاوه بر بیماری‌های ذکر شده، براساس خوداظهاری سابقه

یافته‌ها

بررسی ویژگی‌های جمعیتی نمونه‌های بررسی شده، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین سن بیماران ($51/45 \pm 10/70$) و افراد سالم گروه کنترل ($51/94 \pm 10/15$) نداشت ($P=0/7$). شاخص توده بدنی اختلاف معنی‌داری بین دو گروه نداشت ($P=0/03$). نسبت بروز بیماری در مردان بیش از ۲ برابر زنان بود. داده‌های جمعیتی در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی توزیع ژنوتیپی در جمعیت سالم نشان داد که مقادیر بدست آمده از تعادل هاردی-واینبرگ تبعیت نمی‌کنند ($P < 0/05$). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، فراوانی ژنوتیپ CC در افراد گروه کنترل $42/3\%$ و در افراد گروه بیمار $31/3\%$ بود. ارتباط borderline بین این ژنوتیپ و کاهش خطر بروز CAD مشاهده شد ($P=0/05$). $1/01-$ $95CI:0/36$ درصد، $OR:0/61$). فراوانی آلل تیپ وحشی G در بیماران $57/0\%$ و در افراد سالم $49/0\%$ و فراوانی آلل چندشکل C در گروه بیمار $43/0\%$ و در افراد سالم $51/0\%$ محاسبه شد. نتایج آزمون رگرسیون لجستیک و بررسی تأثیر آلل C در مقایسه با آلل G روی ریسک بروز بیماری، کاهش خطر بروز بیماری در حاملین این آلل را نشان داد ($P=0/02$). $95CI:0/49-0/94$ درصد، $OR:0/68$).



تصویر ۱: محصول T-ARMS PCR مربوط به پلی مورفیسم rs2858060 در ژن Lnc-Ang362 به ترتیب از سمت راست، چاهک اول مربوط به ژنوتیپ هموزیگوت CC ($680 + 467$ جفت باز) می‌باشد. چاهک وسط وضعیت ژنوتیپ یک فرد هتروزیگوت CG را نشان می‌دهد. در چاهک سوم ژنوتیپ هموزیگوت GG با طول باندهای ۲۵۱ و ۶۸۰ جفت باز قابل مشاهده است. اولین چاهک سمت چپ مربوط به سایز مارکر به طول ۱۰۰ جفت باز (فرمتاز، فرانسه) است.

هرگونه بیماری قلبی رد شد. به منظور انجام آزمایش‌های مولکولی، پس از تکمیل فرم رضایت مشارکت آگاهانه در طرح تحقیقاتی توسط کلیه افراد (سالم و بیمار)، ۵ سی‌سی نمونه خون وریدی از افراد گرفته شد و در لوله‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان منتقل گردید. کلیه مراحل تحقیق زیر نظر کمیته پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی با روش رسوب‌دهی به روش نمک اشباع از لوکوسیت‌های خون محیطی انجام گرفت. ژنوتیپ‌های متفاوت جایگاه پلی مورفیسم rs2858060 C/G با روش PCR اختصاصی آلل Tetra-primer amplification refractory mutation system (T-ARMS PCR) تعیین شدند. طراحی پرایمرها برای انجام واکنش PCR توسط نرم‌افزار پرایمر ۱ انجام گرفت (۱۳). توالی پرایمرها و طول محصولات واکنش PCR در جدول ۱ آمده است. واکنش PCR در حجم نهایی $12/5$ میکرولیتر و شامل $6/25$ میکرولیتر مسترمیکس PCR (شرکت یکتاتجهیزآزما، ایران)، $0/5$ میکرولیتر از هر پرایمر خارجی، 1 میکرولیتر از هر پرایمر اختصاصی آلل، 1 میکرولیتر DNA و $2/25$ میکرولیتر آب استریل بود. برنامه تکثیر دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، بدنال آن 35 چرخه که شامل دناتوراسیون در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، اتصال پرایمر در دمای 55 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و تکثیر در دمای 72 درجه به مدت 45 ثانیه بود. واکنش با انجام یک سیکل تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه تکمیل گردید. محصولات کنترل داخلی حاصل از تکثیر به کمک پرایمرهای خارجی به طول 680 جفت باز، محصول آلل C به طول 467 جفت باز و محصول آلل G به طول 251 جفت باز تولید شد که تفکیک محصولات روی ژل آگارز 2% انجام گرفت و براساس حضور نوع خاص باند تکثیر یافته، تعیین ژنوتیپ صورت گرفت (تصویر ۱).

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ انجام گرفت. از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای تعیین نرمالیتی داده‌ها در جمعیت استفاده گردید. بررسی وضعیت تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت کنترل با محاسبه آزمون مجذور خی انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون t -مستقل و ارتباط ژنوتیپی و آللی جایگاه پلی مورفیسم rs2858060 C/G با ریسک بروز CAD با انجام آزمون رگرسیون لجستیک و محاسبه نسبت شانس (OR) با فاصله اطمینان (CI) 95% مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای انجام T-ARMS PCR

پلی مورفیسم	پرایمر	توالی ۵ به ۳
rs2858060 C/G	FO	TTCCTAGCCACCTTATCG
Lnc-Ang362	RO	CTATACTTCTACAGCATACATGAT
	FI (G allele)	TATCCTCAGTTCGTACCA
	RI (C allele)	GCAGTTAAAAAATTCTTCCG

FO: forward outer; RO: reverse outer; FI: forward inner; RI: reverse inner

جدول ۲: خصوصیات دموگرافیک جمعیت مورد بررسی

خصوصیات	کنترل	بیمار	P*
تعداد	۱۴۹	۱۵۰	-
میانگین سن (سال)	۵۱/۹۴±۱۰/۱۵	۵۱/۴۵±۱۰/۷۰	۰/۷
شاخص توده بدنی (kg/m^2)	۲۶/۴۰±۳/۷۲	۲۵/۵۰±۳/۵۰	۰/۰۳
نسبت جنسی (زن/مرد)	۹۹/۵۰	۱۰۵/۴۵	-

* آزمون t-مستقل

جدول ۳: بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs2858060 در توالی غیر کدکننده طولی Lnc-Ang362 با بروز CAD

پلی مورفیسم	کنترل n/	بیمار n/	*P	OR(95%CI)
ژنوتیپ				
GG	۵۶ (۳۷/۶)	۶۹ (۴۶)	-	۱
CG	۳۰ (۲۰/۱)	۳۴ (۲۲/۷)	۰/۷۸	۰/۹۲ (۰/۵۰-۱/۶۸)
CC	۶۳ (۴۲/۳)	۴۷ (۳۱/۳)	۰/۰۵	۰/۶۱ (۰/۳۶-۱/۰۱)
آل				
G	۱۴۲ (۰/۴۹)	۱۷۲ (۰/۵۷)	-	۱
C	۱۵۶ (۰/۵۱)	۱۲۸ (۰/۴۳)	۰/۰۲	۰/۶۸ (۰/۴۹-۰/۹۴)

مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است. * آزمون رگرسیون لجستیک

بحث

مستقیمی در پاتوژنز بیماری نداشته باشند، اما می توانند نقش یک مارکر گویا در پیش آگهی بیماری را ایفا نمایند و به عنوان ابزارهای مولکولی در غربال سریع افراد در معرض خطر بیماری چندعاملی و با توارث پیچیده استفاده شوند (۲۰).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد افراد هموزیگوت CC برای جایگاه مارکر پلی مورف rs2858060 ریسک پایین تری برای ابتلا به CAD دارند. براساس نتایج مطالعات پیشین می توان چنین تصور کرد که در حضور آلل C احتمالاً بیان رونوشت غیر کدکننده طولی Lnc-Ang362 و رونوشت های کوتاه miR-221/222 در پاسخ به AngII کاهش می یابد. در حضور مقادیر کاهش یافته این رونوشت ها تکثیر سلول های ماهیچه صاف عروق خون نیز کاهش می یابد که ارتباط مستقیمی با کاهش وقوع آترواسکروز دارد (۹، ۱۱). یکی از محدودیت های مطالعه حاضر عدم بررسی الگوی بیان رونوشت Lnc-Ang362 در حضور ژنوتیپ های مختلف پلی مورفیسم rs2858060 می باشد. اندازه جمعیت مطالعه شده آنقدر بزرگ نمی باشد که بتوان از خطای نمونه گیری صرف نظر کرد، بنابراین پیشنهاد می شود نتایج مطالعه حاضر در اندازه جمعیت بزرگ تر بررسی گردد.

قدردانی

نویسندگان مقاله از مدیریت محترم بیمارستان خیریه قلب الزهرا (س) جناب آقای دکتر قاضی پور برای همکاری های

آترواسکروز با تغییرات پاتوفیزیولوژیکی متعددی شامل ازدیاد تکثیر و هایپرتروفی سلول های ماهیچه صاف در دیواره عروق خونی مرتبط است (۱۴). آنژیوتانسین II مولکول کلیدی در پیشبرد این تغییرات می باشد که فرایندهای متعددی مانند التهاب، فیروز و رشد سلولی را پیش می برد (۱۵). مکانیسم های مولکولی که پاسخ سلولی به AngII را میانجی گری می کنند به درستی مشخص نمی باشد. نتایج یک مطالعه در سطح وسیع منجر به شناسایی ۴۹۱ رونوشت با بیان افتراقی در پاسخ به AngII گردید. Lnc-Ang362 یکی از انواع رونوشت های جدید در این مجموعه بود که الگوی بیان مشابه با miR-221 و miR-222 نشان داد (۸). miR-221/222 ارتباط نزدیکی با تکثیر سلول های اندوتلیال عروق دارند (۱۶). سطح بیان miR-221/222 در بیماران مبتلا به CAD نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی نشان داده است که این افزایش همراه با کاهش تعداد سلول های پروژنیاتور اندوتلیال می باشد. سلول های پروژنیاتور اندوتلیال نقش مهمی در حفظ یکپارچگی عروق دارند (۱۷). همچنین miR-221 و miR-222 در آنژیوزن، هایپرپلازی اینتیمال، ترمیم آسیب رگ، پیری عروق، التهاب آترواسکروتیک، کلسیفیکاسیون عروق، فشارخون وابسته به AngII و آسیب اندوتلیال ناشی از هیپرگلیسمی دیابتی نقش دارند (۱۸). از آنجایی که Lnc-Ang362 یک رونوشت میزبان برای miR-221/222 است و شروع رونویسی هر سه رونوشت از یک جایگاه انجام می شود، هرگونه تغییر در توالی نوکلئوتیدی، روی بیان هر سه رونوشت اثر می گذارد و عملکردهای وابسته به آنها را تخریب می کند (۱۹، ۲۰). تغییرات تک نوکلئوتیدی مانند SNP ها علی رغم اینکه ممکن است دخالت

منافع متقابل

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

مشارکت مؤلفان

خ ب، م ن و همکاران طراحی و تحلیل نتایج مطالعه را برعهده داشته‌اند. اجرای پژوهش را خ بازویی انجام داده است. تهیه پرسشنامه و شرایط نمونه‌گیری را ه کامفیروزی مشخص نموده است. ویراست اولیه مقاله را م نصیری و خ بازویی نوشته و تأیید نهایی را م نصیری و ه کامفیروزی انجام داده‌اند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این پژوهش در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان با شماره مرجع ۱۶۰۳۰۵۰۳۹۴۱۰۱۲ به تأیید رسیده است.

منابع مالی

ندارد

References

1. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med* 2016; **4**(13): 256. doi: 10.21037/atm.2016.06.33
2. Hirschhorn J N, Daly M J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005; **6**(2): 95-108. doi: 10.1038/nrg1521.
3. Ott J, Wang J, Leal S M. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* 2015; **16**(5): 275-284. doi: 10.1038/nrg3908.
4. Perkel J M. Visiting "noncodamia". *Biotechniques* 2013; **54**(6): 301-304. doi: 10.2144/000114037.
5. Wang K C, Chang H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 2011; **43**(6): 904-914. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.018.
6. Quinn J J, Chang H Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* 2016; **17**(1): 47-62. doi: 10.1038/nrg.2015.10.
7. Shen S, Jiang H, Bei Y, Xiao J, Li X. Long Non-Coding RNAs in Cardiac Remodeling. *Cell Physiol Biochem* 2017; **41**(5): 1830-1837. doi: 10.1159/000471913.
8. Schonrock N, Harvey R P, Mattick J S. Long noncoding RNAs in cardiac development and pathophysiology. *Circ Res* 2012; **111**(10): 1349-1362. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268953.
9. Leung A, Trac C, Jin W, Lanting L, Akbany A, Sætrum P, et al. Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2013; **113**(3): 266-278. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300849.
10. Lin Y J, Kwok C F, Juan C C, Hsu Y P, Shih K C, Chen C C, et al. Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **451**(2): 263-269. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.119.
11. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2009; **104**(4): 476-487. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.185363.
12. Song X, Shan D, Chen J, Jing Q. miRNAs and lncRNAs in vascular injury and remodeling. *Sci China Life Sci* 2014; **57**(8): 826-835. doi: 10.1007/s11427-014-4698-y.
13. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins A R, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**(17): E88-88.
14. Brasier A R, Recinos A, Eledrisi M S. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 2002; **22**(8): 1257-1266.
15. Mehta P K, Griendling K K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292**(1): C82-C97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006
16. Celic T, Metzinger-Le Meuth V, Six I, Massy Z A, Metzinger L. The mir-221/222 Cluster is a Key Player in Vascular Biology via the Fine-Tuning of Endothelial Cell Physiology. *Curr Vasc Pharmacol* 2017; **15**(1): 40-46.
17. Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2009; **39**(5): 359-367. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02110.x.
18. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**(1): 264-269. doi: 10.1073/pnas.0907904107.
19. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2009; **104**(4): 476-487. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.185363.
20. Hofker M H, Fu J, Wijmenga C. The genome revolution and its role in understanding complex diseases. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1842**(10): 1889-1895. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.05

Efficacy of the Moderate Intensity Aerobic training on Heart Rate Variability (HRV) in Patients with the Type-2 Diabetic Neuropathy

**Elaheh Piralaiey^{1*} , Marefat Siahkuhian², Saeed Nikokheslat¹, Lotfali Bolboli², Naser Aslan Abadi³,
Mahboub Sheikhalizadeh⁴, Saeed Fathollahi¹**

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

²Department of Physical Education and Sport Sciences, School of Education and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

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

⁴Department of Physical Education and Sport Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

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

Received: 15 August 2017 Accepted: 21 August 2017 First Published online: 4 July 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):44-52

Abstract

Background: Cardiac autonomic neuropathy (CAN) is a common diabetes complication. Damage of the autonomic nerves distributed in the heart and blood vessels in patients with diabetes may result in CAN and increase their risk of death. Therefore, CAN prevention is of considerable important for these patients. The purpose of this study was to determine the effect of moderate aerobic exercise on heart rate variability (HRV) in type 2 diabetic neuropathy patients.

Methods: In this quasi-experimental clinical trial study, 23 men with diabetic neuropathy were randomly placed at two groups: aerobic training (n=11) and control (n=12). Aerobic training was accomplished for 12 weeks (3 sessions per week, intensity 50%-80% of the reserved heart rate, duration of each session 25-45 min). Heart rate variability of patients was recorded for 20 min at rest and in the supine position before and after 12 weeks of aerobic training.

Results: In aerobic training group, time domain parameters contains SDNN and rMSSD were significantly increased after exercise compared to pre test values. Also in frequency domain parameters, HF was significantly increased and LF/HF ratio was significantly decreased. But in LF parameter was not observed any significantly different. In the control group was not significantly change in time domain and frequency domain parameters. Analysis of inter -group differences showed that changes in all time domain and frequency-domain parameters values (except for the LF Power parameter) in the exercise groups were significantly different from those in the control group.

Conclusion: It seems that moderate intensity aerobic training improved the function of the cardiac autonomic system and hence, improved cardiac rhythm and eventually increased HRV in diabetic neuropathy patients.

Keyword: Aerobic Training, Type-2 Diabetes, Heart Rate Variability (HRV).

How to cite this article: Piralaiey E, Siahkuhian M, Nikokheslat S, Bolboli L, Aslan Abadi N, Sheikhalizadeh M, Fathollahi S. [Efficacy of the Moderate Intensity Aerobic training on Heart Rate Variability (HRV) in Patients with the Type-2 Diabetic Neuropathy]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):44-52. Persian.

مقاله پژوهشی

تاثیر تمرینات هوازی با شدت متوسط بر تغییر پذیری ضربان قلب (HRV) در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی

الهه پیرعلایی^{۱*}، معرفت سیاه کوهیان^۲، سعید نیکوخصلت^۱، لطفعلی بلبلی^۲، ناصر اصلان آبادی^۲، محبوب شیخعلی زاده^۳، سعید فتح الهی^۱

^۱ گروه آموزشی فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
^۲ گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
^۳ گروه قلب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴ گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
 *نویسنده مسئول: epiralaiei@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۳۰ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۴۴-۵۲

چکیده

زمینه: نوروپاتی اتونوم قلبی عروقی (CAN) یک عارضه شایع در دیابت می‌باشد. آسیب اعصاب اتونوم توزیع شده در قلب و عروق خونی در بیماران دیابتی، ممکن است منجر به CAN و افزایش خطر مرگ در آنها شود. بنابراین پیشگیری از CAN برای بیماران دیابتی اهمیت قابل توجهی دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر تمرینات ورزشی هوازی با شدت متوسط بر تغییرپذیری ضربان قلب (HRV) در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی بود.
روش کار: در این کارآزمایی بالینی نیمه تجربی، ۲۳ مرد دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی به طور تصادفی به دو گروه تمرینی (۱۱ نفر) و کنترل (۱۲ نفر) تقسیم شدند. تمرین هوازی به مدت دوازده هفته (سه جلسه تمرین در هفته با شدت ۵۰ تا ۸۰ درصد ضربان قلب ذخیره، به مدت ۲۵ تا ۴۵ دقیقه در هر جلسه) اجرا شد. تغییرپذیری ضربان قلب (HRV) بیماران، توسط دستگاه هولترمانیتورینگ در حالت استراحت و خوابیده به پشت برای ۲۰ دقیقه، قبل و بعد از ۱۲ هفته تمرینات هوازی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در گروه تمرینی، پارامترهای زمان محور شامل SDNN و rMSSD بعد از اتمام دوره تمرینی افزایش معناداری نسبت به مقادیر قبل از تمرین داشتند. همچنین از پارامترهای فرکانس محور، HF به طور معنی‌داری افزایش یافته بود و نسبت LF/HF به طور معناداری کاهش یافته بود، ولی در پارامتر LF تفاوت معناداری مشاهده نشد. در گروه کنترل پارامترهای زمان محور و فرکانس محور تغییر معناداری نداشتند. نتایج تحلیل تفاوت‌های بین گروهی نیز نشان داد که کلیه مقادیر پارامترهای زمان محور و فرکانس محور (به غیر از پارامتر LF Power) گروه‌های تمرینی با گروه کنترل تفاوت معناداری داشت.
نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین هوازی با شدت متوسط می‌تواند از طریق بهبود عملکرد سیستم اتونوم قلبی منجر به بهبودی ریتم‌های قلبی و در نهایت افزایش تغییرپذیری ضربان قلب در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی شود.

کلید واژه‌ها: تمرین هوازی، دیابت نوع ۲، تغییر پذیری ضربان قلب (HRV).

نحوه استناد به این مقاله: پیرعلایی ا، سیاه کوهیان م، نیکوخصلت س، بلبلی ل، اصلان آبادی ن، شیخعلی زاده م، فتح الهی س. تاثیر تمرینات هوازی با شدت متوسط بر تغییرپذیری ضربان قلب (HRV) در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۴۴-۵۲

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 ملیتوس نوعی بیماری متابولیک است که در نتیجه اختلال در عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و مقاومت به انسولین ایجاد می‌شود که عوارض مختلفی را به دنبال دارد (۱). مقاومت به انسولین نقش کلیدی در تشدید (گسترش) دیابت نوع ۲ داشته و ممکن است باعث دیس لیپیدیمی (وجود لیپیدهای غیرطبیعی در خون) و هایپرتنشن و در نتیجه افزایش خطر بیماری‌های قلبی عروقی شود (۲). علاوه بر آن، آسیب اعصاب اتونوم توزیع شده در قلب و عروق خونی در بیماران دیابتی، ممکن است منجر به نوروپاتی اتونوم قلبی عروقی (Cardiovascular Autonomic Neuropathy (CAN و افزایش خطر مرگ در آنها شود (۳). بنابراین پیشگیری از CAN برای بیماران دیابتی اهمیت قابل توجهی دارد. در بیماران مبتلا به دیابت، علایم تحت بالینی CAN در ۲۰-۳۰ درصد موارد قابل تشخیص بوده و معمولاً زمانی تشخیص داده می‌شود که بیمار دچار عارضه نوروپاتی شده است (۴) و به دلیل تشخیص دیر هنگام CAN درصد مرگ و میر بیماران بالا و در حدود ۵۶-۲۷ درصد است (۵). بنابراین در بیماران دیابتی CAN نیازمند یک تشخیص زود هنگام می‌باشد که لازمه آن استفاده از شاخص تغییرپذیری ضربان قلب Heart Rate Variability (HRV) است به طوری که با تشخیص به موقع و با بهبود کنترل قندخون می‌توان از CAN پیشگیری کرد (۶). تغییرپذیری ضربان قلب به عنوان شاخصی غیرتهاجمی، عملی و تکرارپذیر از عملکرد و سطح فعالیت سیستم عصبی اتونوم قلبی است (۷) که دلالت بر تغییرات ضربه به ضربه در زمان ضربان‌های متوالی قلب داشته (۸) و کاهش در آن با ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی در ارتباط است (۹). تغییرپذیری ضربان قلب یک ابزار قدرتمند در بررسی نحوه تعدیل‌گری اتونوم قلبی بوده و نشانگر تعادل بین سیستم‌های عصبی سمپاتیک و پاراسمپاتیک می‌باشد (۸). مطالعات نشان داده‌اند که تغییرپذیری ضربان قلب در افرادی که دارای سبک زندگی غیرفعال دارند و در افرادی که دارای بیماری‌های قلبی عروقی، ایمنی و متابولیک هستند، کاهش می‌یابد (۱۱) که در بسیاری از این بیماری‌ها کاهش تغییرپذیری ضربان قلب پیشگویی بر مرگ‌های ناگهانی است (۱۱، ۱۲). بیماری دیابت باعث ایجاد اختلال در تعادل سیستم عصبی اتونوم می‌شود، به طوری که بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به افراد سالم، کاهش قابل توجهی در تغییرپذیری ضربان قلب را نشان می‌دهند (۱۳) و این کاهش منجر به پیشرفت بیماری‌های قلبی عروقی و دیس فانکشن متابولیکی می‌شود (۱۴). بویژه مشخص شده است که کاهش بیشتر مساوی یک (≥ 1) در پارامترهای HRV پیشگوکننده

معناداری از مرگ‌های قلبی ناگهانی است (۱۵، ۱۶). ورزش و فعالیت بدنی منظم به عنوان یک روش مفید برای کنترل دیابت نوع ۲ و بهبود تغییرپذیری ضربان قلب مطرح می‌باشد (۱۷). تمرینات ورزشی عملکرد قلبی را از طریق مهار عملکرد اعصاب سمپاتیک و فعال‌کردن سیستم عصبی پاراسمپاتیک بهبود بخشیده (۱۸) و منجر به تعادل در عملکرد سیستم عصبی اتونوم می‌شود (۱۹). علی رغم اهمیت تغییرپذیری ضربان قلب به عنوان یک ابزار پیش آگهی در ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی به خصوص در بیماران دیابتی و تاثیری که تمرینات ورزشی می‌تواند در بهبود HRV داشته باشد، مطالعاتی که تاثیر ورزش بر تغییرپذیری ضربان قلب را در بیماران دیابتی به خصوص بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی مورد بررسی قرار دهد، بسیار کمیاب می‌باشد و بویژه در داخل کشور مطالعاتی در این زمینه انجام نپذیرفته است. در خصوص تحقیقات خارجی، نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که تمرینات منظم ورزشی باعث افزایش پارامترهای تغییرپذیری ضربان قلب و در نتیجه بهبود HRV در بیماران دیابتی می‌شود (۲۰ و ۲۱ و ۲۲). از سوی دیگر نتایج برخی مطالعات، حاکی از آن است که اگرچه تمرینات منظم ورزشی باعث افزایش مقادیر پارامترهای HRV می‌شود، ولی این افزایش در پارامترها معنادار نبود (۱)، بنابراین با توجه به عدم تشابه نتایج مطالعات مختلف و خلاء تحقیقاتی در این خصوص در داخل کشور، ضروری به نظر می‌رسد مطالعه‌ای در خصوص تاثیر تمرینات ورزشی بر تغییرپذیری ضربان قلب انجام پذیرد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر ۱۲ هفته تمرینات هوازی با شدت متوسط بر تغییرپذیری ضربان قلب (HRV) در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی و فراهم کردن اطلاعات پایه اثرات درمانی و پیشگیرانه ورزش بر CAN می‌باشد.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع نیمه تجربی و به صورت مداخله‌ای شامل گروه آزمایش و کنترل با پیش آزمون و پس آزمون بود. آزمودنی‌های تحقیق را مردان ۶۷-۳۵ ساله مبتلا به دیابت شهر تبریز که طی فراخوانی داوطلب شرکت در طرح تحقیقاتی حاضر بودند، تشکیل داد. پس از آن که شرایط اولیه ورود به تحقیق شامل سابقه دیابت بیش از ۵ سال، عدم ابتلا به بیماری قلبی و عروقی، ریوی، اسکلتی و عضلانی و سرطان، عدم فعالیت ورزشی روزانه، عدم منع پزشکی از ورزش و HbA1c بین ۶/۶ تا ۱۲ درصد بیماران محرز شد، افراد واجد شرایط برای تشخیص ابتلای آنها به نوروپاتی محیطی، به بیمارستان

معرفی شدند و معاینات مربوطه توسط ابزارهای کلینیکی در بیمارستان به عمل آمد و بعد از مشخص شدن ابتلای بیماران به عارضه نوروپاتی محیطی، از میان داوطلبان، ۳۰ بیمار دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی وارد پژوهش شدند. سپس آزمودنی‌ها از لحاظ سلامتی قلبی به وسیله تست ورزش مورد ارزیابی قرار گرفته و افرادی که دارای هر نوع عارضه قلبی بودند (بیماری کرونری قلبی، آریتمی و نارسایی قلبی حاد) از تحقیق حذف شدند (۲ نفر) که نهایتاً ۲۸ مرد دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی که از نظر تست ورزش سالم بودند و امکان شرکت در فعالیت ورزشی را داشتند به عنوان آزمودنی‌های نهایی انتخاب شدند. معیارهای خروج از تحقیق شامل عدم توانایی از اجرای تمرینات، عدم پیروی از برنامه‌های ورزشی ارائه شده در گروه تجربی و حضور نامنظم در تمرینات و ابتلا به بیماری‌های قلبی، ریوی، سرطان و عصبی-عضلانی شدید بود. این تحقیق از کمیته تحقیقات انسانی دانشگاه علوم پزشکی دارای تاییدیه اخلاقی (کد اخلاقی طرح IR.TBZMED.REC.1395.754) بود و فرم رضایت‌نامه کتبی و فرم آمادگی شرکت داوطلبانه از کلیه بیماران دریافت شد. سپس آزمودنی‌ها به طور تصادفی به دو گروه تمرینی (۱۳ نفر) و کنترل (۱۵ نفر) تقسیم شدند. گروه تمرینی بعد از گذراندن دو هفته مرحله آشنایی با تمرینات وارد دوره ۱۲ هفته‌ای تمرینات هوازی با سه جلسه در هفته شدند. ابتدا آزمودنی‌ها طی دو جلسه حضور در آزمایشگاه از لحاظ عوامل آنتروپومتریک (قد، وزن، شاخص توده بدن و درصد چربی) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری قد از دستگاه قدسنج سکا مدل ۷۶۹ آلمان با تقریب یک میلی‌متر، وزن بدن آزمودنی‌ها با کاموشیتا (Kamoshita) با تقریب ۰/۱ کیلوگرم و برای اندازه‌گیری ترکیب بدن از دستگاه Inbody 230 استفاده شد. از ۲۸ داوطلب شرکت‌کننده در پژوهش حاضر، ۵ نفر در مراحل مختلف مطالعه به دلایل مختلف شخصی انصراف دادند که در نهایت ۲۳ نفر موفق به تکمیل دوره تمرینی شدند. برای بدست آوردن نمونه‌های خونی، آزمودنی‌ها، یک‌بار در ابتدای مطالعه و یک بار هم ۴۸ ساعت بعد از اتمام آخرین جلسه ۱۲ هفته‌ای تمرینات هوازی، صبحگاه به صورت ناشتا (۱۲ ساعت) در ساعت مقرر در آزمایشگاه حاضر شده و هر بار ۱۰ سی سی خون از ورید آنتی‌کوبیتال در وضعیت نشسته توسط متخصص آزمایشگاه گرفته شد و مقادیر غلظت قندخون ناشتا، هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) و پروفایل چربی (تری‌گلیسرید، کلسترول، HDL و LDL) اندازه‌گیری و برای مقایسه ثبت شد. جهت همسان‌سازی رژیم غذایی در روزهای قبل از خونگیری، در جلسه اول برگه یادآمد غذایی به آزمودنی‌ها

داده شد و از آنها خواسته شد تا رژیم غذایی قبل از خونگیری اول را ثبت کنند و در روز قبل از جلسه خونگیری نهایی (بعد از دوره تمرینی)، همان رژیم غذایی یا مشابه آن را پیروی کنند. قبل از شروع پروتکل اصلی تحقیق به منظور آشنایی با تمرینات، آزمودنی‌ها دو هفته تمرین هوازی با شدت ۶۰ درصد ضربان قلب ذخیره را ۳ جلسه در هفته به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه انجام دادند. سپس دوره اصلی تمرینات هوازی شامل ۳ جلسه تمرین در هفته و به مدت ۱۲ هفته آغاز شد. برنامه شامل ۱۵ دقیقه گرم کردن (شامل حرکات کششی و فعالیت سبک)، ۲۵ تا ۴۵ دقیقه فعالیت اصلی (با شدت ۷۰ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه) و ۱۰ دقیقه سردکردن (حرکات کششی) 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 (۲۳). (جدول ۱). شدت تمرینات با استفاده از دستگاه ضربان‌سنج پلار ساخت فنلاند تنظیم شد (در محدوده ± 5 ضربه خطا از ضربان قلب محاسبه شده). اندازه‌گیری تغییرپذیری ضربان قلب (HRV) آزمودنی‌ها قبل از ظهرها و در بازه زمانی ۷-۱۱ صبح و به صورت ناشتا در یک اتاق نیمه تاریک و ساکت با دمای ۲۶-۲۱ در حالت خوابیده به پشت انجام گرفت. از آزمودنی‌ها خواسته شد تا ۲۴ ساعت قبل از اندازه‌گیری فعالیت سنگین و ورزش نداشته باشند. طی ۱۲ ساعت قبل از اندازه‌گیری از مصرف هر گونه مواد کافئین دار و سیگار منع شدند و از آزمودنی‌ها خواسته شد تا شب قبل از اندازه‌گیری حداقل ۸ ساعت خواب شبانه را داشته باشند. همچنین از آزمودنی‌ها خواسته شد با وسیله نقلیه در آزمایشگاه حضور یابند و صبح روز اندازه‌گیری از پیاده‌روی یا دویدن خودداری نمایند. قبل از آغاز ثبت رکوردهای ضربان قلب، برای حفظ حالت پایدار بدن ابتدا آزمودنی‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حالت خوابیده به پشت استراحت کردند، سپس ضربان قلب آزمودنی‌ها (فواصل R-R) به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه هولترمانیتورینگ قلب ثبت شد (۱۱). برای این کار از دستگاه هولترمانیتورینگ مدل VX3+ کمپانی DMS آمریکا به همراه نرم افزار Full Option استفاده شد. هفت الکتروود ثبت ECG به قسمت جلویی قفسه سینه آزمودنی‌ها وصل شده و بعد از ثبت ECG توسط هولتر، داده‌ها برای اندازه‌گیری HRV به نرم افزار منتقل شد. برای تفسیر تغییرات HRV از آنالیز پارامترهای زمان محور و فرکانس محور استفاده گردید. پارامترهای فرکانس محور شامل امواج با فرکانس بالا (HF: 0.15-0.5 HZ) که به طور عمده منعکس‌کننده فعالیت عصب پاراسمپاتیک است، امواج با فرکانس پایین (LF: 0.04-0.15 HZ) که به طور عمده نشان

برابر $30/14 \pm 3/65$ کیلوگرم بر مترمربع و میانگین نسبت دور کمر به باسن برابر $0/95 \pm 0/03$ سانتی متر بود (جدول ۱). نتایج بدست آمده نشان داد که تغییرات درون گروهی ترکیب بدن آزمودنی‌های گروه تمرینی شامل وزن، شاخص توده بدنی، درصد چربی و نسبت دور کمر به باسن و HbA1c بعد از گذراندن ۱۲ هفته دوره تمرینی کاهش معنی‌داری نسبت به قبل از ورزش آنها داشت ($P < 0/05$). این در حالی بود که در گروه تمرینی بعد از کامل کردن دوره ورزشی، میزان گلوکز خون ناشتا و پروفایل چربی (تری گلیسرید، کلسترول، HDL، LDL) نسبت به قبل از ورزش تفاوت معناداری نداشته و یا کمی افزایش یافته بود. بعلاوه نتایج تغییرات درون گروهی گروه کنترل نشان داد که متغیرهای نسبت دور کمر به باسن، شاخص توده بدنی و کلسترول افزایش معناداری نشان دادند ($P < 0/05$)، بقیه شاخص‌های آنترپومتریک و بیوشیمیایی خون تفاوت معناداری نداشت ($P > 0/05$) (جدول ۲).

دهنده فعالیت عصب سمپاتیک و همچنین پس روی در فعالیت عصب پاراسمپاتیک است و نسبت LF/HF که تعادل اتونوم را نشان می‌دهد می‌باشند و پارامترهای زمان محور مورد استفاده شامل انحراف استاندارد تمامی فواصل نرمال The standard deviation of all normal R-R (SDNN)R-R (intervals) و جذر میانگین مربع تفاوت‌های متوالی (rMSSD) Root Mean Square Successive Differences می‌باشند (۱۲). برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. برای مقایسه تفاوت‌های درون گروهی از تحلیل واریانس اندازه‌گیری مکرر و در ادامه از تحلیل t وابسته و برای بررسی تفاوت‌های بین گروهی از روش t مستقل استفاده گردید.

یافته‌ها

میانگین سن آزمودنی‌ها به ترتیب برابر $55/24 \pm 8/12$ سال بود و میانگین قد و وزن بیماران به ترتیب $171/85 \pm 6/98$ و $89/54 \pm 13/81$ بود. میانگین شاخص توده بدن (BMI) آنها

جدول ۱: ویژگی‌های آنترپومتریک آزمودنی‌ها

گروه‌های مورد مطالعه	تعداد	سن (سال)	قد (سانتیمتر)	وزن (کیلوگرم)	شاخص توده بدن	سابقه بیماری
تمرینی	۱۱	$57/54 \pm 5/43$	$174/14 \pm 6/40$	$91/75 \pm 13/89$	$30/39 \pm 3/36$	$14/27 \pm 7/54$
کنترل	۱۲	$53/17 \pm 9/63$	$170/38 \pm 6/90$	$91/79 \pm 16/24$	$30/93 \pm 5/12$	$12/33 \pm 5/65$

جدول ۲: تغییر در شاخص‌های ترکیب بدن و بیوشیمیایی

نتیجه آزمون	انحراف استاندارد $\pm$ میانگین		گروه‌ها	متغیرها
	بعد از تمرین	قبل از تمرین		
$0/048^*$	$89/69 \pm 12/80$	$91/75 \pm 13/89$	تمرینی	وزن (کیلوگرم)
$0/729$	$91/54 \pm 17/23$	$91/79 \pm 16/24$	کنترل	
$0/001^{**}$	$26/25 \pm 6/33$	$33/48 \pm 4/26$	تمرینی	درصد چربی
$0/582$	$30/30 \pm 6/67$	$30/86 \pm 5/65$	کنترل	
$0/005^{**}$	$0/94 \pm 0/037$	$0/96 \pm 0/033$	تمرینی	نسبت دور کمر به دور باسن
$0/006^{**}$	$0/95 \pm 0/037$	$0/94 \pm 0/035$	کنترل	
$0/166$	$29/45 \pm 3/21^*$	$30/39 \pm 3/36$	تمرینی	شاخص توده بدنی (BMI) (کیلوگرم بر مترمربع)
$0/001$	$31/29 \pm 5/32$	$30/93 \pm 5/12$	کنترل	
$0/649$	$148 \pm 40/76$	$142/64 \pm 39/48$	تمرینی	گلوکز خون ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)
$0/740$	$149/75 \pm 61/59$	$156/75 \pm 55/57$	کنترل	
$0/014^*$	$6/29 \pm 0/79$	$7/12 \pm 1/17$	تمرینی	HbA1C (درصد)
$0/055$	$6/82 \pm 1/14$	$7/26 \pm 1/01$	کنترل	
$0/094$	$154/91 \pm 52/21$	$136/27 \pm 41/85$	تمرینی	کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)
$0/023^*$	$171/25 \pm 61/37$	$137/33 \pm 34/12$	کنترل	
$0/225$	$210/64 \pm 125/24$	$170/63 \pm 81/56$	تمرینی	تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)
$0/222$	$321/92 \pm 489/36$	$205/42 \pm 185/09$	کنترل	
$0/288$	$75/87 \pm 27/08$	$69/54 \pm 29$	تمرینی	LDL (میلی گرم بر دسی لیتر)
$0/899$	$77/05 \pm 21/02$	$76/27 \pm 23/19$	کنترل	
$0/914$	$38/18 \pm 5/69$	$38/36 \pm 6/68$	تمرینی	HDL (میلی گرم بر دسی لیتر)
$0/430$	$31/92 \pm 8/06$	$32/83 \pm 9/79$	کنترل	

$^{***} P < 0/001$

$^{**} P < 0/05$

جدول ۳: نتایج آزمون تحلیل واریانس برای بررسی پارامترها با لحاظ کردن تاثیر عاملی گروه

پارامترها	ارزش لامبدا ویلکز	مقدار F	P زمان	P زمان [*] گروه
SDNN	۰/۴۰۹ ۰/۵۶۲	۱۴/۵۶ ۱۶/۳۷	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱**
rMSSD	۰/۷۳۷ ۰/۷۵۵	۷/۵۱ ۶/۸۱	۰/۰۱۲*	۰/۰۱۶*
LF Power	۰/۹۴۵ ۱/۰۰	۱/۲۳ ۰/۰۰۰	۰/۲۷۹	۰/۹۹۳
HF Power	۰/۱۷۶ ۰/۲۲۵	۹۸/۰۸ ۷۲/۴۰	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱**
LF/HF Ratio	۰/۰۳۶ ۰/۸۰۴	۰/۷۸۵ ۵/۱۱	۰/۳۸۶	۰/۰۳۵*

***P < ۰/۰۰۱; **P < ۰/۰۱; *P < ۰/۰۵

جدول ۴: میانگین و انحراف استاندارد تغییرات درون گروهی و بین گروهی پارامترهای HRV

پارامترها	گروه های مورد مطالعه	قبل از تمرین	بعد از تمرین	P درون گروهی	P بین گروهی
(SDNN (ms	تمرینی کنترل	۳۷/۴۰±۱۵/۷۳ ۲۹/۹۲±۱۵/۳۸	۴۹±۱۴/۱۵ ۲۹/۵۸±۱۳/۶۲	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱**
rMSSD (ms	تمرینی کنترل	۱۶/۸۰±۷/۷۳ ۱۶±۵/۰۳	۲۳/۷۰±۷/۶۶ ۱۶/۱۷±۶/۱۳	۰/۰۱۲**	۰/۰۰۱**
(LF Power (ms ²	تمرینی کنترل	۴۲۳/۸۵±۴۷۵/۱۶ ۲۵۰/۳۷±۲۸۵/۱۸	۴۹۵/۴۷±۴۲۷/۵۴ ۳۳۴/۴۹±۴۳۱/۲۴	۰/۶۲۳	۰/۹۹۳
(HF Power (ms ²	تمرینی کنترل	۷۶/۴۱±۶۳/۳۵ ۴۶/۴۹±۳۲/۹۸	۲۹۵/۹۸±۶۹/۰۰ ۶۵/۱۰±۸۱/۵۴	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱**
LF/HF Ratio	تمرینی کنترل	۵/۰۴±۲/۶۶ ۴/۹۵±۳/۵۹	۳/۶۰±۳/۴۰ ۷/۲۸±۱۲/۴۳	۰/۰۰۶**	۰/۰۳۵*

داده های جدول به صورت انحراف استاندارد ± میانگین در هر گروه بیان شده اند.

P < ۰/۰۱

P < ۰/۰۵

دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی بود. با توجه به آسیب پذیری بودن سیستم اعصاب اتونوم در برابر عدم تعادل بین اعصاب سمپاتیک و پاراسمپاتیک توزیع شده به قلب و عروق، و متعاقب آن مستعد بودن بیماران دیابتی برای ابتلا به CAN. در نتیجه پارامترهای زمان محور HRV شامل SDNN و rMSSD (فعالیت اعصاب پاراسمپاتیک) در بیماران دیابتی نسبت به افراد عادی کاهش می یابد (۲۴). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مردان دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی تمرین کرده بعد از گذراندن ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط، از پارامترهای زمان محور HRV، هر دو پارامتر SDNN و rMSSD، افزایش معنی داری نسبت به دوره قبل از مطالعه داشتند (P < ۰/۰۱)؛ در حالی که در مقادیر پارامترهای زمان محور گروه کنترل تفاوت معنی داری وجود نداشت. همچنین مقادیر پارامترهای SDNN و rMSSD در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری دارد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعات Goit و همکاران (۲۰۱۴) که نشان داده اند تمرینات ورزشی باعث بهبود پارامترهای زمان محور SDNN و rMSSD شده است (۲۵)، همخوانی دارد. SDNN به عنوان حامل قویترین اطلاعات پیش آگهی در بیماری های قلبی (۲۵)، نشان دهنده فعالیت کلی سیستم عصبی اتونوم و rMSSD منعکس کننده تنظیم کلی اتونوم با اجزاء پاراسمپاتیک است

با توجه نتایج آزمون تحلیل واریانس اندازه گیری مکرر در مورد مقایسه داده های پیش آزمون و پس آزمون تغییرات پارامترهای زمان محور (SDNN و rMSSD) و فرکانس محور (HF Power) و LF/HF Ratio با لحاظ کردن تاثیر عاملی گروه (شامل گروه کنترل و گروه تمرین) معنادار بود (جدول ۳)، در نتیجه لازم است تا بررسی های بیشتری انجام شود. بنابراین در ادامه مقادیر پارامترها در طول مداخله با استفاده از آزمون t وابسته به طور درون گروهی مقایسه شده اند که نتایج آن در جدول ۴ ذکر گردیده است. نتایج نشان داد تمامی پارامترهای زمان محور و فرکانس محور HRV به جز LF در گروه تمرینی به طور معنی داری افزایش یافته بود. اگرچه پارامتر LF افزایش داشت ولی معنادار نبود. این در حالی بود که در گروه کنترل این پارامترها یا تغییر معنی داری نداشته یا کاهش یافته بود. نتایج تحلیل تفاوت های بین گروهی نیز نشان داد که در کلیه پارامترهای مورد بررسی (به غیر از پارامتر LF Power) بین گروه تمرینی با گروه کنترل تفاوت معناداری وجود دارد (جدول ۴).

بحث

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر ۱۲ هفته تمرینات هوازی با شدت متوسط بر تغییر پذیری ضربان قلب (HRV) در بیماران

قلبی دارد (۲۰). مطالعات نشان داده است که تمرینات ورزشی باعث بهبود فراهمی زیستی NO و عملکرد آندوتلیال می‌شود (۲۱). میانجی دوم، آنژیوتانسین II، یک مهارکننده شناخته شده فعالیت واگ قلبی است (۲۲). ورزشکاران و افراد تمرین کرده نسبت به غیر ورزشکاران و افراد بی تمرین، کمترین سطح فعالیت رنین پلازما و در نتیجه کمترین سطح آنژیوتانسین II را نشان داده‌اند (۳۰). با این وجود مشخص شدن مکانیسم دقیق نحوه اثر تمرینات ورزشی بر HRV و اتونوم قلبی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه‌گیری می‌توان گفت که ۱۲ هفته تمرینات منظم هوازی در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی از طریق افزایش تون واگی قلبی و کاهش اثر سمپاتیک قلبی منجر به بهبود معنادار در عملکرد اتونوم قلبی عروقی و HRV می‌شود. به علاوه یافته‌های تحقیق حاضر بیان می‌کند که سه بار در هفته تمرین هوازی با شدت متوسط برای بیماران دیابتی بی‌خطر بوده و می‌تواند به عنوان یک ابزار کمک درمانی در روند مدیریت این بیماری باشد.

قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری تخصصی خانم الهه پیرعلائی در رشته تربیت بدنی و علوم ورزشی-گرایش قلب و عروق و تنفس در دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد. معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی دستگاه هولتر مانیتورینگ مورد استفاده در این پژوهش را خریداری کرد و در اختیار محقق قرار داد. بدین وسیله از حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی تشکر و قدردانی می‌نمایم. همچنین از همه کسانی که مستقیم یا غیر مستقیم در انجام این پژوهش همکاری کرده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی: پروتکل مورد مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، استان آذربایجان شرقی به شماره مرجع IR.TBZMED.REC.1395.754 به تایید رسیده است.

منابع مالی: منابع مالی ندارد.

منافع متقابل: مولف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مولفان: اپ و م س و همکاران. طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. همچنین همه نویسندگان مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

(۱۲ و ۲۶). افزایش SDNN به معنای افزایش در انحراف استاندارد فواصل نرمال R-R و به عبارت دیگر افزایش در تغییرپذیری ضربان-های قلب و افزایش rMSSD به معنای مداخله بیشتر پاراسمپاتیک بوده در نتیجه نشان‌دهنده کارآمدی سیستم عصبی اتونوم در پاسخ به شرایط متغیر محیطی است. به عبارت دیگر آنالیز زمان محور HRV نشان‌دهنده افزایش فعالیت پاراسمپاتیک در بیماران دیابتی در پاسخ به تمرینات ورزشی می‌باشد (۲۵). همچنین نتایج پژوهش Kang و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که ۱۲ هفته تمرینات ترکیبی (هوازی و قدرتی) بر پارامترهای SDNN و rMSSD تاثیر معناداری ندارد (۱) که با نتیجه تحقیق حاضر ناهمخوان می‌باشد. احتمالاً علت ناهمخوانی مربوط به متفاوت بودن شدت و مدت تمرین و همچنین متفاوت بودن آزمودنی‌ها باشد. همچنین در مطالعه حاضر، تحلیل تغییرات درون گروهی داده‌های فرکانس محور HRV نشان داد که در مردان دیابتی مبتلا به نوروپاتی محیطی، مداخله ورزشی باعث افزایش معناداری در پارامتر HF Power، کاهش معناداری در نسبت LF/HF و عدم تفاوت معنادار در پارامتر LF Power شد. همچنین افزایش مقادیر HF Power و نسبت LF/HF گروه تمرینی با گروه کنترل معنادار می‌باشد. به طور کلی HF منعکس‌کننده فعالیت پاراسمپاتیک، LF منعکس‌کننده فعالیت سیستم‌های سمپاتیک و پاراسمپاتیک (۲۷) و نسبت LF/HF بیان‌کننده تعادل سمپاتوواگال می‌باشد (۲۶). از آنجایی که در بیماران دیابتی HRV با افزایش میانجیگری سمپاتیک و پس روی پاراسمپاتیک کاهش می‌یابد در نتیجه تغییر در پارامترهای HRV آنها با افزایش پارامتر LF و نسبت LF/HF و کاهش پارامتر HF همراه است (۳ و ۱۶). هسو و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقات خود نشان دادند که فعالیت ورزشی از طریق افزایش در تون واگ و تنظیم تعادل سمپاتوواگال، تاثیر قابل توجهی بر بهبود HRV بیماران قلبی دارد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش‌های Hsu و همکاران (۲۰۱۵)، Goit و همکاران (۲۰۱۴) و Ricca-Mallada و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد (۲۵ و ۲۸ و ۲۹). مکانیسمی که توسط آن تمرینات ورزشی باعث بهبود HRV می‌شود هنوز به طور کامل شناخته نشده است. اما احتمال می‌رود که تمرینات ورزشی از طریق افزایش تون واگی و کاهش اثر سمپاتیک قلبی باعث بهبود HRV می‌شود (۱۲ و ۱۹) که با نتایج پژوهش حاضر نیز همخوانی دارد. تصور بر این است که در افزایش تون واگی قلب در پاسخ به تمرینات ورزشی حداقل دو میانجی نقش ایفا می‌کنند که عبارتند از: نیتریک اکساید (NO) و آنژیوتانسین II. احتمال می‌رود که NO اثر مستقیمی بر تون واگی قلب و اثر غیرمستقیمی بر اعصاب سمپاتیک

References

1. Kang S J, Ko K J, Baek U H. Effects of 12 weeks combined aerobic and resistance exercise on heart rate variability in type 2 diabetes mellitus patients. *J Phys Ther Sci* 2016; **28**(7): 2088-2093. doi: 10.1589/jpts.28.2088
2. Ginsberg H N. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000; **106**(4): 453-458. doi: 10.1172/JCI10762
3. Vinik A I, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* 2007; **115**(3): 387-397. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.634949
4. Stella P, Ellis D, Maser R E, Orchard T J. Cardiovascular autonomic neuropathy (expiration and inspiration ratio) in type 1 diabetes. Incidence and predictors. *J Diabetes Complicat* 2000; **14**(1):1-6. doi: 10.1016/S1056-8727(00)00054-4
5. Ewing D J, Campbell I W, Clarke B F. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *QJM* 1980; **49**(193): 95-108. doi: 10.1093/oxfordjournals.qjmed.a067610
6. Jacob G, Costa F, Biaggioni I. Spectrum of autonomic cardiovascular neuropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2003; **26**(7): 2174-2180. doi: 10.2337/diacare.26.7.2174
7. Billman G E. Heart rate variability – a Historical Perspective. *Front Physiol* 2011; **2**(86): 1-13. 10.3389/fphys.2011.00086
8. Freeman J V, Dewey F E, Hadley D M, Myers J, Froelicher V F. Autonomic nervous system interaction with the cardiovascular system during exercise. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; **48**(5): 342-62. doi: 10.1016/j.pcad.2005.11.003
9. Van Boven A J, Jukema J W, Haaksma J, Zwinderman A H, Crijns H J, Lie K I. Depressed heart rate variability is associated with events in patients with stable coronary artery disease and preserved left ventricular function. REGRESS Study Group. *AM Heart J* 1998; **35**(4): 571-576. doi: 10.1016/S0002-8703(98)70269-8
10. Zuern C S, Barthel P, Bauer A. Heart rate turbulence as risk-predictor after myocardial infarction. *Front Physiol* 2011; **2**(99): 1-8. doi: 10.3389/fphys.2011.00099
11. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 1996; **93**: 1043-1065. doi: 10.1161/01.CIR.93.5.1043
12. Routledge F S, Campbell T S, McFetridge-Durdle J A, Bacon S L. Improvements in heart rate variability with exercise therapy. *Can J Cardiol* 2010; **26**(6): 303-312. doi: 10.1016/S0828-282X(10)70395-0
13. Keyl C, Lemberger P, Palitzsch K D, Hochmuth K, Liebold A, Hobbhahn J. Cardiovascular autonomic dysfunction and hemodynamic response to anesthetic induction in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. *Anesth Analg* 1999; **88**(5): 985-991. doi: 10.1213/00000539-199905000-00004
14. Liao D, Carnethon M, Evans G W, Cascio W E, Heiss G. Lower heart rate variability is associated with the development of coronary heart disease in individuals with diabetes: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Diabetes* 2002; **51**(12): 3524-3531. doi: 10.2337/diabetes.51.12.3524
15. Bilchick K C, Fetcs B, Djoukeng R, Fisher S G, Fletcher R D, Singh S N, et al. Prognostic value of heart rate variability in chronic congestive heart failure (Veterans Affairs' Survival Trial of Antiarrhythmic Therapy in Congestive Heart Failure). *Am J Cardiol* 2002; **90**(1): 24-28. doi: 10.1016/S0002-9149(02)02380-9
16. Kienzle M G, Ferguson D W, Birkett C L, Myers G A, Berg W J, Mariano D J. Clinical, hemodynamic and sympathetic neural correlates of heart rate variability in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1992; **69**(8): 761-767. doi: 10.1016/0002-9149(92)90502-P
17. Sanz C, Gautier J F, Hanaire H. Physical exercise for the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2010; **36**(5): 346-351. doi: 10.1016/j.diabet.2010.06.001
18. Rosenwinkel E T, Bloomfield D M, Arwady M A, Goldsmith R L. Exercise and autonomic function in health and cardiovascular disease. *Cardiol Clin* 2001; **19**(3): 369-387. doi: 10.1016/S0733-8651(05)70223-X
19. Carter J B, Banister E W, Blaber A P. The effect of age and gender on heart rate variability after endurance training. *Med Sci Sport Exer* 2003; **35**(8): 1333-1340. doi: 10.1249/01.MSS.0000079046.01763.8F
20. Chowdhary S, Townend J N. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clin Sci* 1999; **97**(1): 5-17. doi: 10.1042/cs0970005
21. Kingwell B A. Nitric oxide as a metabolic regulator during exercise: effects of training in health and disease. *Clin Exp Pharmacol P* 2000; **27**(4): 239-250. doi: 10.1046/j.1440-1681.2000.03232.x
22. Townend J N, al-Ani M, West J N, Littler W A, Coote J H. Modulation of cardiac autonomic control in humans by angiotensin II. *Hypertension* 1995; **25**(6): 1270-1275. doi: 10.1161/01.HYP.25.6.1270
23. Sigal R J, Kenny G P, Boule N J, 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. *Ann Intern Med* 2007; **147**(6): 357-369. doi: 10.7326/0003-4819-147-6-2007-09180-00005

24. Lishner M, Akselrod S, Avi V M, Oz O, Divon M, Ravid M. Spectral analysis of heart rate fluctuations. A non-invasive, sensitive method for the early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *J Autonom Nerv Syst* 1987; **19**(2): 119-125. doi: 10.1016/0165-1838 (87)90005-1
25. Goit R K, Paudel B H, Khadka R, Roy R K, Shrewastwa M K. Mild-to-moderate intensity exercise improves cardiac autonomic drive in type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* 2014; **5**(6): 722-727. doi: 10.1111/jdi.12238
26. Cygankiewicz I, Zareba W. Heart rate variability. *Handbook of Clinical Neurology* 2013; **117**(3): 379-393. doi: 10.1016/B978-0-444-53491-0.00031-6
27. Moak J P, Goldstein D S, Eldadah B A, Saleem A, Holmes C, Pechnik S, et al. Supine low frequency power of heart rate variability reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation. *Heart Rhythm* 2007; **4**(12): 1523-1529. doi: 10.1016/j.hrthm.2007.07.019
28. Hsu CHY, Hsieh P L, Hsiao SHF, Chien M Y. Effects of Exercise Training on Autonomic Function in Chronic Heart Failure: Systematic Review. *Bio Med Res Int* 2015; **2015**: 1-8. doi: 10.1155/2015/591708
29. Ricca-Mallada R, Migliaro E R, Piskorski J, Guzik P. Exercise training slows down heart rate and improves deceleration and acceleration capacity in patients with heart failure. *J Electrocardiol* 2012; **45**(3): 214-219. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2012.01.002
30. Fagard R, Grauwels R, Groeseneken D, Lijnen P, Staessen J, Vanhees L, et al. Plasma levels of renin, angiotensin II, and 6-ketoprostaglandin F1 alpha in endurance athletes. *J Appl Physiol* 1985; **59**(3): 947-952.

Bacteriocin production by *Lactobacillus* spp. And study on it's antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms

Fatemeh Kheirollahi¹, Masoumeh Anvari^{2*}

¹Ph.D Student, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

²Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

*Corresponding author: anvari@iaurasht.ac.ir

Received: 22 July 2017 Accepted: 18 September 2017 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):53-60

Abstract

Background: Bacteriocins are antimicrobial proteins which prevent the growth of sensitive strains. The aim of study is to produce antimicrobial products using the lactic acid bacteria separated from low fat yogurt and survey on their antimicrobial activity.

Methods: At the first *Lactobacillus* separated from two kinds of pasteurized yogurt of Gilan and then its effect on *E.coli* and a *staphylococcus aureus* was studied by disc and gel diffusion methods. Also effect of different physicochemical factors on bacteriocin production was evaluated, using Taguchi methodology.

Results: The greatest zone diameter and the highest rate of production and *E.coli* (17 mm). This diameter was observed in PH 5, inoculation size 20%, temperature 25°C, Glucose and yeast extract as the carbon and nitrogen sources. The result analysis of variants showed that carbon and nitrogen type had significant product.

Conclusion: The results in optimized MRS broth medium show that the best bacteriocin production in the optimized environment was 70% greater and it could be prevent the bacterial growth property

Keyword: Probiotic, Bacteriocin, Optimization, *Lactobacillus*.

How to cite this article: Kheirollahi F, Anvari M. [Bacteriocin production by *Lactobacillus* spp. And study on it's antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):53-60. Persian.

مقاله پژوهشی

تولید باکتریوسین توسط اعضای جنس لاکتوباسیلوس و مطالعه عملکرد ضد میکروبی آن در برابر برخی میکروارگانیسم های بیماری زا

فاطمه خیراللهی^۱، معصومه انوری^{۲*}

^۱ دانشجوی دوره دکتری زیست شناسی، گرایش میکروبیولوژی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
^۲ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
انوری@iaurasht.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۳۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۵۳-۶۰

چکیده

زمینه: باکتریوسینها مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی هستند که از رشد سویه های حساس جلوگیری می کنند. هدف از این تحقیق بررسی تولید محصولات ضد میکروبی توسط باکتریهای های اسید لاکتیک جدا شده از ماست پاستوریزه کم چرب و بررسی اثر ضد میکروبی آنهاست. **روش کار:** در این مطالعه ابتدا باکتریوسین توسط لاکتوباسیلوس جدا شده از دو نوع ماست پاستوریزه تولید و سپس اثر آن روی دو باکتری *E. coli* و *Staphylococcus aureus* با دو روش دیسک و ژل دیفیوژن علیه دو گونه باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شد. همچنین اثر فاکتورهای مختلف فیزیکوشیمیایی در تولید باکتریوسین ارزیابی گردید. **یافته ها:** یافته ها نشان داد که بیشترین قطر هاله و تولید باکتریوسین علیه باکتری *E. coli* (۱۷ میلی متر) در $PH=5$ و میزان تلقیح ۲۰٪ و دمای ۲۵° سانتیگراد و منبع کربن و ازت کمکی به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر مشاهده شد. آنالیز واریانس نتایج نشان داد. منبع کمکی ازت و کربن اثر معناداری در تولید داشته اند. **نتیجه گیری:** مقایسه قطر هاله حاصل از باکتریوسین تولید شده در محیط MRS broth بهینه شده نشان داد که تولید باکتریوسین در محیط بهینه سازی شده تقریباً ۷۰ (تقریباً ۱/۵ برابر) درصد دارای افزایش می باشد و به خوبی از رشد باکتریهای بیماری زا جلوگیری می کند.

کلید واژه ها: پروبیوتیک، باکتریوسین، بهینه سازی، اعضای جنس لاکتوباسیلوس

نحوه استناد به این مقاله: خیراللهی ف، انوری م. تولید باکتریوسین توسط اعضای جنس لاکتوباسیلوس و مطالعه عملکرد ضد میکروبی آن در برابر برخی میکروارگانیسم های بیماری زا. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۵۳-۶۰

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کریئو 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

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده هستند که با حفظ و یا بهبود تعادل میکروبی روده مصرف‌کنندگان، به نفع سلامت آنها عمل می‌کنند (۱). باکتری‌های پروبیوتیک با توجه به فواید سلامتی آنها، به طور فزاینده‌ای در طول دو دهه گذشته در ماست و شیر تخمیر شده استفاده شده‌اند. اولین مشاهدات از نقش مثبت میکروارگانیسم‌ها اولین بار توسط دانشمند پراوازه روسی‌الی مچنیکوف معرفی گردید، کسی که در اوایل قرن بیستم پیشنهاد کرد که امکان تغییر فلور روده‌ای و جایگزینی میکروب‌های مضر با میکروب‌های مفید وجود دارد. مچنیکوف استاد مؤسسه پاستور پاریس این نظریه را مطرح کرد که پدیده پیری در نتیجه فعالیت میکروب‌های عامل گندیدگی (پروتولیتیک) که در روده بزرگ مواد سمی تولید می‌کنند، حاصل می‌شود. باکتری‌های پروتولیتیک مانند کلوستریدیوم‌ها که بخشی از فلور طبیعی روده را تشکیل می‌دهند، از هضم پروتئین‌ها تولید مواد سمی می‌کنند که شامل: فنول‌ها، اندول‌ها و آمونیاک می‌گردد. بر اساس عقیده مچنیکوف این ترکیبات مسئول ایجاد مسمومیت روده بودند که باعث تغییرات فیزیکی مرتبط با پیری می‌شدند. در این زمان مشخص شده بود که شیرهای تخمیر شده با باکتری‌های اسید لاکتیک به علت پایین آوردن PH در اثر تخمیر لاکتوز از رشد باکتری‌های پروتولیتیک ممانعت می‌کردند. بیفیدوباکتری‌ها نیز اولین بار از نوزادی که از شیر پستان تغذیه شده بود توسط هنری تیسیرجداسازی گردیدند. باکتری جداسازی شده باسیلوس بیفیدوس نام گرفت و بعداً به جنس بیفیدوباکتریوم تغییر نام داد. تیسیر متوجه گردید که بیفید و باکتری‌ها در فلور روده نوزادان تغذیه شده از شیر پستان غالب هستند و او همچنین فواید کلینیکی از درمان اسهال نوزادان با بیفیدوباکتری‌ها را مشاهده کرد و دریافت که جایگزینی بیفیدوباکتری‌ها با باکتری‌های پروتولیتیک باعث بیماری می‌گردد (۲). لاکتوباسیل‌ها مانند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، و بیفیدوباکتری‌ها که اغلب به عنوان 'بیفیدوس' خطاب می‌شوند، شایع‌ترین آنها بوده‌اند (۳). شواهد علمی رو به رشدی برای حمایت از این مفهوم وجود دارد که حفظ میکروفلور روده‌ای سالم ممکن است حفاظت در برابر اختلالات گوارشی از جمله عفونت‌های دستگاه گوارش، بیماری‌های التهابی روده، و حتی سرطان را فراهم کند (۴). باکتریوسین‌ها پپتیدهای ضد میکروبی ساخته شده توسط ریبوزوم‌ها هستند که توسط باکتری‌ها تولید شده و به طور معمول علیه سویه‌های مشابه ارگانیسم تولیدکننده خود فعالیت می‌کنند (۵). پروبیوتیک‌ها علاوه بر تولید باکتریوسین، قادر به تولید سایر متابولیت‌های دیگر با خاصیت ضد میکروبی هستند. این مواد شامل اسیدهای چرب آزاد، اتانول، دی استیل استن، اسید لاکتیک، و ۳-بوتان دی ال، استالید، بنزوئیک اسید و گلیکوپروتئین‌های با فعالیت بیولوژیک قوی می‌باشند. این مواد با

اثر ممانعت‌کنندگی از رشد سایر میکروارگانیسم‌های واقع در محیط اکولوژیکی پروبیوتیک‌ها در دفاع غیر اختصاصی اهمیت دارند (۶). مطالعات بسیاری توسط پژوهشگران خارجی و داخلی در این زمینه انجام گرفته که از آن جمله می‌توان به بررسی Amel Rehaian و همکاران در سال ۲۰۱۴ اشاره کرد. بر روی اتروکوکوس فکاليس جدا شده از یک محصول لبنی خاص در تونس از نظر تحمل نمک‌های صفراوی و مقاومت اسید و شیره گوارشی و خواص چسبندگی تحقیق نموده‌اند. از ویژگی‌های جالبی که باکتری نشان داد مدت و تحمل عبور از دستگاه گوارش و توانایی بقاء در PH های پایین و نمک‌های صفراوی بود. علاوه بر این ژنوم این سویه برای شناختن ژن‌های تولیدکننده اتروسین با روش PCR ارزیابی (۷). Mengfei Peng و همکاران در سال ۲۰۱۵ مصرف پری‌بیوتیک و پروبیوتیک به عنوان مکمل غذایی روزانه را روشی مطلوب برای کنترل عفونت‌های مزمن روده یا بهبود سلامت روده دانسته. با مطالعه اثر لاکتو باسیلوس کازئی بر رشد و حدت خواص پاتوژن‌های روده ناشی از اشرشیاکلی EDL933 و سالمونلا تیفی موریوم LT2 و لیستریا مونوسیتوژنز LM2 مورد بررسی قرار دادند. کشت مخلوط لاکتوباسیلوس کازئی با هر یک از عوامل بیماری‌زا نشان داد که لاکتو باسیلوس کازئی به علت حذف یا مهار رشد ۹۹ درصد از پاتوژنها در ۴۸ ساعت شود (۸). Weerapong Woraprayote و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مطالعه بر روی باکتری *Weissella hellenica* BCC7239 جدا شده از سوسیس تخمیر شده گوشت خوک در تایلند که دریافتند که این باکتری قادر است دو باکتریوسین جدید به نام A ۷۲۹۳، B تولید نماید که هر دو آنها طیف ضد میکروبی وسیعی برای مهار چند پاتوژن گرم منفی غذا (سودوموناس آئروژینوزا، آئروموناس هیدروفیلا سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیاکلی) داشتند. بیشترین میزان باکتریوسین در محیط‌های کشت MRS و APT در دمای ۳۰ درجه بدون تکانش تولید شدند. باکتریوسین A۷۲۹۳ فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به B۷۲۹۳ نشان داد. با این حال PH و مقاومت حرارتی باکتریوسین A ۷۲۹۳ کمتر بود. فعالیت ضد میکروبی هر دو پپتید نیز توسط حلال‌های آلی (اتانول، استون، استونیتریل و ایزوپروپانول) و سورفاکتانت‌ها (توئین ۲۰، توئین ۸۰ و تریتون X-100) تحت تاثیر قرار نگرفت. باکتریوسین‌ها ۷۲۹۳ A، B7293 دارای اثر ضد باکتری در برابر هر دو نوع گرم مثبت و گرم منفی بدون لیز سلولی بود. از آنجایی که توده مولکولی آنها شبیه به باکتریوسین‌های شناسایی شده قبلی بود هر دو باکتریوسین A ۷۲۹۳ B می‌تواند باکتریوسین جدید باشند. بنابراین از هر دو باکتریوسین جدید می‌توان در برنامه‌های کاربردی و پیشگیری یا درمان عفونت‌های بیماریزا به عنوان غذا و مواد افزودنی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها برای افزایش بهره‌وری مواد غذایی جانداران استفاده

کرد (۹). اما در ایران در مطالعه‌ای که توسط Mirdamadi و همکاران در سال ۱۳۹۰ در تهران انجام گرفت. ۲ سویه از باکتری-های لاکتیک از محصولات لبنی جدا کردند. آنها با استفاده از رسوبدهی با ایزوپروپانول و آمونیوم سولفات و سپس دیالیز و کروماتوگرافی باکتریوسین را تخلیص نموده و بر روی ۸ سویه استاندارد باکتری گرم مثبت، گرم منفی و مخمر اثر داده شدند. نتایج حاصل نشان داد سویه‌های جدا شده بومی قادر به تولید مواد باکتریوسینی هستند که به میزان بیشتر علیه *Micrococcus Loteus*، *Staphylococcus epidermidis* و *Bacillus cereus* و به مقدار کمتر بر روی *Listeria monocytogenes* موثر می‌باشد. در بین میکروارگانیسم‌های شاخص *Micrococcus Loteus* به عنوان حساس‌ترین باکتری و *Candida albicans* به عنوان مقاوم‌ترین ارگانیسم شناخته شدند (۱۰). در تحقیقی دیگر که توسط الهه کیلی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در گرگان انجام گرفت اثر ضد باکتریایی ۹۶ سویه باکتری اسید لاکتیک جدا شده از ۳۶ نمونه ماست محلی بر علیه ۷ گونه مهم پاتوژن‌های گوارشی به خصوص *E. coli*، *Yersinia enterocolitica*، *Shigella dysenteriae* و *Salmonella typhimurium* با دو روش انتشار در آگار به کمک دیسک و روش چاهک با استفاده از محلول رویی تهیه شده از محیط کشت باکتریها بررسی گردید. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک و چاهک اندازه‌گیری شد و به منظور کاهش خطا، هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد روی محیط مولر هیتون آگار اندازه‌گیری و ثبت شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گونه‌های *L. lactis* و *casei* در روش چاهک بود و حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آنها ۱۸ میلی‌متر ارزیابی شد. بیشترین و کمترین اثر مهارتی علیه باکتری‌های پاتوژن به ترتیب روی یرسینیا انتروکولیتیکا و باسیلوس سرئوس مشاهده شد (۱۱). با توجه به اهمیت تولید باکتریوسین توسط اعضای جنس لاکتوباسیلوس و نقش مهم بالینی این ماده، این تحقیق با هدف تولید و بهینه‌سازی آن و همچنین بررسی اثر ضد میکروبی محصول تولید شده روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا صورت پذیرفت.

روش کار

کشت از دو نوع ماست کم چرب پاستوریزه شرکت‌های کاله و سارا با انتقال مستقیم نمونه‌ها توسط فیلدوپلاتین بر روی محیط MRS آگار استریل با تکنیک کشت خطی انجام شد. بعد از کشت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت در شرایط *microaerophile* در جارحای دی اکسیدکربن انجام گرفت. محیط MRS agar محیطی اختصاصی برای رشد و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک است نیازهای پیچیده آنها را فراهم می‌سازد کشت داده شد این محیط دارای رنگ قهوه‌ای شفاف و

حاوی استات سدیم است که رشد بسیاری از باکتریهای رقیب را سرکوب می‌کند. اگرچه بعضی از باکتری‌های لاکتیک مانند لوکونوستوک *Leuconostoc* و پدیوکوکوس *Pediococcus* ممکن است رشد کنند. ۸۰ Polysorbate در این محیط سورفاکتانتی است که به جذب مواد مغذی توسط لاکتوباسیل‌ها کمک می‌کند. سولفات منیزیم و سولفات منگنز موجود در محیط برای ارائه کاتیون‌های مورد نیاز در سوخت و ساز بکار می‌روند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون از نمونه‌ها لام تهیه شد و رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت. برای اثبات وجود لاکتوباسیلوس مورفولوژی نمونه‌ها زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. و برخی آزمایشات نظیر تست کاتالاز، حرکت، انعقاد شیر، تحمل فنل، تحمل NaCl انجام پذیرفت. با استفاده از این آزمایش می‌توان وجود آنزیم کاتالاز را در باکتری مشخص نمود. در صورتی که باکتری واجد آنزیم کاتالاز باشد، با اضافه کردن آب اکسیژنه به کلنی برداشته شده باکتری بر روی لام، واکنش انجام شده به صورت تولید آب و اکسیژن بوده که به صورت حباب‌هایی نمایان می‌گردد. در صورتی که باکتری فاقد آنزیم کاتالاز باشد، بعد از اضافه نمودن کلنی، هیچ گونه تغییری ایجاد نمی‌گردد و در نهایت باکتری کاتالاز منفی می‌باشد (۱۲). به منظور تست حرکت از محیط SIM استفاده و پس از کشت به مدت ۴۸ ساعت در جار میکروانروفل گرمخانه‌گذاری و نتایج حرکت یا عدم حرکت باکتریها بررسی شد. مثبت بودن حرکت با تشکیل توده ابرمانند پس از تلقیح در محیط تأیید گردید. برای آزمایش انعقاد شیر در محیط Skim milk کشت انجام شد و پس از ۴۸ ساعت تحت شرایط میکروانروفل گرمخانه‌گذاری انجام شد. به منظور تست تحمل فنل ۱ گرم فنل در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و از محلول حاصله ۴۰۰ میکرولیتر به لوله-های حاوی MRS برات استریل افزوده شد تا فنل ۰/۴٪ تهیه شود. ۱۰۰ میکرولیتر باکتری به هر لوله افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور به ۳۷°C و در جار میکروانروفل قرار گرفت. سپس نتایج به صورت ایجاد کدورت برای تست مثبت و عدم ایجاد کدورت لوله‌ها برای مورد منفی مشخص شدند. برای تست تحمل NaCl از رقت‌های ۱ تا ۱۰ درصد NaCl استفاده شد. ۱ میلی لیتر از هر غلظت به محیط MRS broth افزوده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری به محیط‌ها تلقیح کرده و لوله‌ها داخل جار بی‌هوای و انکوباتور به ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. نتیجه تست با مشاهده ایجاد کدورت بررسی گردید. پس از بررسی اثر ضد میکروبی مستقیم به محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سولفات آمونیوم (۴۰ درصد v/v) اضافه شد و روی همزن برقی به مدت سه ساعت در مجاور یخ همزده شد و پس از آن به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. روز بعد مایع داخل ارلن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در 6000 (rpm) سانتریفیوژ شد محلول رویی دور ریخته شد و

ضد میکروبی اولیه در پیش آزمایشات لاکتوباسیلی که بهترین اثر ضد میکروبی را نشان داد بررسی اترمهاری در آزمایشات بهینه سازی صرفا روی همین باکتری انجام شد.

یافته‌ها

پس از ۴۸ ساعت تشکیل کلنی‌ها حاکی از این بود که باکتری‌ها در محیط MRS رشد کرده‌اند. کلنی‌ها به رنگ سفید و گرد با سطحی صاف و به اندازه حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر بودند. خصوصیات میکروسکوپی بر اساس رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که باکتری به شرح ذیل است. گرم مثبت، میله‌ای شکل، آرایش نا مشخص، طول باکتری‌ها، بین ۱۰-۵ میکرومتر، غیراسپورزا. در مجموع ۵ سویه باکتریایی جدا شده و از سویه‌های جداسازی شده ۵ کلنی انتخاب گردید و جهت شناسایی آزمایشات ادامه یافت. برای باکتری‌های جدا شده از ماست‌ها، تست‌های شناسایی لاکتوباسیل‌ها انجام گردید. جهت تست کاتالاز پس از اضافه کردن آب اکسیژنه به کلنی برداشته شده از باکتری برای همه نمونه‌ها حباب گاز تشکیل شد و مشخص گردید که باکتری دارای آنزیم کاتالاز و کاتالاز مثبت است. برای تست حرکت پس از طی زمان انکوباسیون نتایج بررسی شد. در تمامی لوله‌ها در اطراف محل تلقیح با آنس، توده ابر مانند تشکیل شده بود و مثبت بودن حرکت هم بدین صورت اثبات گردید. برای تست انعقاد شیر پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر نتایج بررسی شدند. باکتری‌ها در انتهای لوله تشکیل لخته داده بودند و تست انعقاد شیر مثبت بود، و جهت تست تحمل فنل تمام لوله‌های کشت داده شده برای این منظور، پس از پایان زمان انکوباسیون بررسی شدند. هیچ کدام از لوله‌های حاوی فنل و نمونه، کدورت نداشتند و این تست برای همه باکتری‌ها منفی بود.

در تست NaCl در غلظت ۱ تا ۱۰ درصد تحمل NaCl مبنای تشخیص بهترین رشد از نظر ظاهری کدورت لوله‌ها بوده است که نشان دهنده رشد باکتری می‌باشد. برای بررسی رشد کشت مایع کدورت ایجاد شده در محیط MRS براث نشانه رشد باکتری‌ها بود. نتایج مربوط به تولید باکتریوسین با اندازه‌گیری وزن رسوب (طبق پروتکل استاندارد) و نتایج مرتبط با مهار رشد با اندازه‌گیری هاله عدم رشد مشخص گردید. در فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین به روش ژل دیفیوژن مرحله میزان عدم رشد سویه‌های لاکتوباسیل علیه سویه‌های بیماریزا بررسی گردید (جدول شماره ۱).

رسوبات با دقت جمع‌آوری گردید. به رسوب حاصله بافر فسفات سدیم ۵٪ مولار با $\text{pH}=6$ به حجم ۵۰۰ میکرولیتر اضافه گردید و رسوبات به خوبی حل شد. این ماده به عنوان باکتریوسین خالص شده برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی اثر ضد میکروبی باکتریوسین به روش ژل دیفیوژن از باکتری‌های *E.coli* و *Staphylococcus aureus* استفاده شد. ابتدا از محیط کشت مایع، باکتری با کدورت استاندارد با سوآپ استریل در سطح محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و سپس چاهک‌هایی به قطر ۳-۵ میلی‌متر در مرکز پلیت‌ها حفر گردید. برای جلوگیری از پخش شدن مواد در زیر پلیت، ته هر کدام از چاهک‌ها با یک قطره آگار مسدود گردید. سپس از محلول رسوبات حل شده در بافر فسفات سدیم به اندازه ۵۰ میکرولیتر در داخل چاهک‌ها ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کرده و سپس قطره‌هاله‌های عدم رشد بررسی گردید (۱۳). برای بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین به روش دیسک دیفیوژن آگار در مرحله اول دیسک‌های بلانک تهیه شده، استریل شدند سپس با پنس استریل داخل محلول باکتریوسین (حل شده در بافر فسفات سدیم) قرار گرفتند تا کامل مرطوب شدند سپس این دیسک‌ها داخل یک پلیت خالی استریل گذاشته تا خشک شدند، سپس به طور جداگانه در مرکز پلیت حاوی محیط نوترینت آگار کشت داده شده با باکتری‌های *E.coli* و *Staphylococcus aureus* قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شده و سپس قطره‌هاله عدم رشد بررسی گردید. به منظور بهینه سازی تولید باکتریوسین از نرم افزار Minitab 16 و روش طراحی آزمایش تاگوچی استفاده گردید. در این روش ۵ فاکتور فیزیکوشیمیایی شامل دمای انکوباسیون، pH ، منابع ازت و کربن کمکی و میزان تلقیح در ۴ سطح طراحی گردیدند و اثر ضد میکروبی باکتریوسین در سطوح منابع ازت، بررسی میزان تلقیح در تولید باکتریوسین و میزان فعالیت ضد باکتری باکتریوسین در pH ‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳-۳). لازم به ذکر است که اندازه‌گیری تولید باکتریوسین در پیش آزمایشات پس از ۱۰ و ۲۴ و ۷۲ ساعت از شروع کشت انجام شد. پیش آزمایش نشان دهنده بیشترین تولید در ساعت دهم از شروع رشد میکروارگانیسم در محیط کشت مایع بود و به همین دلیل تمامی آنالیزها جهت بررسی میزان تولید در ساعت دهم از شروع کشت انجام شد و چون بیشترین قطر هاله عدم رشد در پیش آزمایشات متعلق به *E.coli* بود آزمایشات بهینه‌سازی بر روی همین باکتری انجام شد. همچنین از بررسی اثر

جدول ۱: نتایج قطر هاله عدم رشد لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از ماست بر باکتری‌های بیماریزا

سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده		قطر هاله عدم رشد استافیلوکوک اورئوس (بر حسب میلی‌متر)		قطر هاله عدم رشد اشرفیاکول (بر حسب میلی‌متر)	
L1	۸				
L2	۴				
		۱۰		۵	

جدول ۲: آنالیز واریانس داده‌ها

منبع	DF	Seq SS	P-value
منبع کربن کمکی	۳	۰/۲۱۷۱۲۱	۰/۰۰۶
منبع ازت کمکی	۳	۰/۱۲۲۴۱۴	۰/۰۱۷
تلقیح	۳	۰/۰۱۳۸۴۷	۰/۱۰۹
دما	۳	۰/۰۴۵۶۰۴	۰/۰۸۶
PH	۳	۰/۱۳۳۵۱۴	۰/۴۸

همانطور که مشاهده می‌شود دو فاکتور منبع کربن کمکی و منبع ازت کمکی اثر معناداری در تولید باکتریوسین نشان داد.

جدول ۳: نتایج آزمایشات ۱۶ گانه بهینه سازی تولید باکتریوسین توسط سویه لاکتوباسیلوس

شماره بستر	PH	دمای انکوباسیون (درجه سانتی گراد)	میزان تلقیح (v/v)	نوع منبع ازت کمکی	نوع منبع کربن کمکی	قطر هاله عدم رشد (میلی متر)
۱	۴	۲۵	٪۵	*	*	۷
۲	۵	۳۰	٪۱۰	پپتون	*	۹
۳	۶	۳۵	٪۱۵	عصاره مخمر	*	۱۰
۴	۷	۴۰	٪۲۰	سولفات آمونیوم	*	۸
۵	۷	۳۵	٪۱۰	*	گلوکز	۹
۶	۶	۴۰	٪۵	پپتون	گلوکز	۹
۷	۵	۲۵	٪۲۰	عصاره مخمر	گلوکز	۱۷
۸	۴	۳۰	٪۱۵	سولفات آمونیوم	گلوکز	۱۰
۹	۵	۴۰	٪۱۵	*	زایلوز	۱۱
۱۰	۴	۳۵	٪۲۰	پپتون	زایلوز	۹
۱۱	۷	۳۰	٪۵	عصاره مخمر	زایلوز	۱۲
۱۲	۶	۲۵	٪۱۰	سولفات آمونیوم	زایلوز	۶
۱۳	۶	۳۰	٪۲۰	*	گالاکتوز	۸
۱۴	۷	۲۵	٪۱۵	پپتون	گالاکتوز	۱۰
۱۵	۴	۴۰	٪۱۰	عصاره مخمر	گالاکتوز	۱۳
۱۶	۵	۳۵	٪۵	سولفات آمونیوم	گالاکتوز	۱۲

آزمایش تاگوچی با مطالعه اثر پنج فاکتور در چهار سطح به ترتیب مشخص گردید که فاکتورهای منبع کربن کمکی، منبع ازت کمکی در تولید باکتریوسین اثر معنادار داشته و PH و میزان تلقیح و دمای انکوباسیون اثر معناداری در تولید نداشته است. تاگوچی یک روش در طراحی آزمایش است که مزایایی نسبت به روش‌های سنتی دارد. روشهای سنتی بهینه‌سازی فرایندهایی زمان بر هستند و واکنش میان متغیرهای متقابل فیزیکی شیمیایی قابل بررسی نیست اما تاگوچی تأثیرات منبع کربن و ازت کمکی، در صد تلقیح، درجه حرارت و PH را به صورت منفرد و متقابل بر تولید باکتریوسین توصیف می‌کند (۱۴). در میان بسترهای مورد آزمایش بستر ۷ بیشترین قطر هاله عدم رشد را بر باکتری E. coli نشان داد که ۱۷ میلی‌متر بود. این میزان قطر هاله عدم رشد در PH=۵ و میزان تلقیح ۲۰٪ و دمای ۲۵° سانتی‌گراد و منبع کربن و ازت کمکی به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر نشان داده شد. PH فاکتوری مهم برای رشد باکتری‌هاست انواع مختلف لاکتوباسیلها قادرند PH بین ۹-۱ را تحمل کنند اما رشد مطلوب آنها معمولاً در PH بین ۲ تا ۵ انجام می‌شود (۱۵). گرچه تحلیل آماری نشان داد که بهترین PH اثر معناداری در تولید باکتریوسین ندارد اما بررسی اثر تک فاکتور نشان داد که بهترین PH برای تولید بیشترین میزان باکتریوسین PH=۵ است. بر اساس نظر poolman و koning مصرف ترکیبات

در پیش آزمایشات بدون بهینه‌سازی بیشترین قطر هاله عدم رشد توسط سوش لاکتوباسیلوس L1 جدا شده از ماست سارا برای باکتری اشرشیاکلی اندازه ۱۰ میلی‌متر و برای استافیلوکوک قطر هاله ۸ میلی‌متر بود. نتایج در روش دیسک دیفیوژن آگار بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت هاله عدم رشد مشاهده نشد. همان‌طور که در جدول شماره ۳ مشاهده گردید بهترین شرایط برای تولید باکتریوسین در بستر شماره ۷ بوده است. لذا بهترین تولید در PH=۵ و دمای ۲۵° و میزان تلقیح ۲۰٪ (V/V) بوده و گلوکز و عصاره مخمر به ترتیب به عنوان بهترین منبع کربن کمکی و منبع ازت کمکی بوده است که در تولید ایفای نقش کرده اند. در این شرایط قطر هاله عدم رشد برای باکتری به ۱۷ میلی‌متر می‌رسد که در مقایسه با آزمایشات بدون بهینه‌سازی به طور قابل توجهی بالاتر است و نشان از افزایش تولید باکتریوسین دارد.

بحث

این تحقیق با هدف بررسی توانایی میکروارگانیسمهای پروبیوتیک تولیدکننده باکتریوسین مورد استفاده در صنایع لبنی و عوامل تأثیرگذار بر تولید آنها انجام شده است. طی روش طراحی

مختلف کربن کمکی و تولید باکتریوسین رابطه معنادار وجود دارد ($P < 0.05$). و قند گلوکز بهترین منبع کربن کمکی در تولید باکتریوسین است. محققان مختلف اثر منابع کربن کمکی را بر رشد لاکتوباسیلوسها و تولید بیومس مورد بررسی قرار داده‌اند. منبع ازت از ضروریات رشد میکروارگانیسمها به منظور ساخت پروتئینها و بازهای آلی است. تحقیق حاضر نشان داد که میان نوع منبع ازت کمکی و تولید باکتریوسین رابطه معنادار وجود دارد ($P < 0.05$). بهترین منابع ازت کمکی در این تحقیق عصاره مخمر بوده که استفاده از آن منجر به تولید بیشترین میزان باکتریوسین گردید. در این شرایط قطر هاله عدم رشد باکتریوسین تولیدی توسط سویه لاکتوباسیلوس (L1) در برابر باکتری اشرشیاکلی ۱۷ میلی متر بود.

نتیجه‌گیری

در تحقیق انجام شده ابتدا باکتریوسین توسط لاکتوباسیلوس جدا شده از ماست تولید و سپس تولید باکتریوسین با استفاده از روش طراحی آزمایش تاگوچی (Minitab16) بهینه سازی گردید. و سپس اثر آن روی دو باکتری *E. coli* و *Staphylococcus aureus* با دو روش دیسک و ژل دیفیوژن بررسی گردید. نتایج اولیه نشان-دهنده اثر مهار باکتریوسین تولیدی بود. سپس با روش تاگوچی بهینه‌سازی گردید و بهترین شرایط تولید بستر شماره آزمایش ۷ از میان بسترهای ۱۶ گانه آزمایشی بود. این شرایط شامل $PH=5$ و میزان تلقیح 2.0×10^6 (v/v) و دمای $25^\circ C$ سانتی‌گراد و منبع کربن و ازت کمکی به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر بوده و قطر هاله آن برابر ۱۷ میلی‌متر حاصل گردید. مقایسه قطر هاله حاصل از باکتریوسین تولید شده در دو محیط MRS براث و MRS براث بهینه شده نشان داد که تولید باکتریوسین در محیط بهینه‌سازی تقریباً ۷۰ درصد دارای افزایش می‌باشد.

قدردانی

بدین ترتیب نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت که در طول انجام پایان‌نامه کارشناسی ارشد همکاریهای لازم را مبذول داشتند ابراز می‌دارند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده رابط با کد شناسایی ۶۱۳۳۰۵۰۷۹۴۱۰۱۴ دانشگاه آزاد واحد رشت می‌باشد. ملاحظات اخلاقی شامل مقاله فوق نمی‌باشد.

این مقاله منابع مالی ندارد.

منافع متقابل: نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان: ف. خ و م. الف طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته و مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

پیتیدی در آب پنیر (که یکی از شاخص‌های رشد محسوب می‌شود) به PH بستگی دارد. PH بهینه برای گونه *Lactis* ۶/۵ تعیین شده است. بدان گونه که در مقادیر بالاتر یا پایین تر از این مقدار رشد بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۱۶). باتوجه به این که تولید باکتریوسین‌ها از ساعت ابتدایی فاز لگاریتمی آغاز می‌شود و تا قبل از رسیدن به نقطه اوج آن پایان می‌یابد (حد اکثر تا ۱۰ ساعت از شروع کشت) PH تاثیرگذار بر رشد اثر مستقیم بر تولید باکتریوسین‌ها خواهد داشت. مژگانی و همکاران در تحقیق خود در خصوص بررسی ویژگیهای باکتریوسین لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس در یافتند که گرچه این باکتریوسین در PH های بین ۳ تا ۱۱ فعال بوده اما بهترین فعالیت ضد میکروبی خود را در PH بین ۵ تا ۶ نشان داد (۱۷). بنابراین به نظر می‌رسد که هم بهینه PH تولید و هم بهینه فعالیت باکتریوسین در این محدوده است. علاوه بر موارد ذکر شده به نظر می‌رسد PH های پایین تر از ۵ و بالاتر از ۷ باعث تغییر در ساختار پروتئینها بویژه باکتریوسین‌ها می‌گردند (۱۸). در این تحقیق گرچه میزان تلقیح اثر معنی‌داری بر تولید باکتریوسین نشان نداد اما بررسی اثر تک فاکتورها نشان داد در میان در صدهای تلقیح مورد آزمایش بیشترین میزان هاله عدم رشد در 2.0×10^6 (V/V) تلقیح مشاهده گردید. درجه حرارت از سایر فاکتورهای تاثیرگذار بر تولید باکتریوسین مورد بررسی در این تحقیق بود. آنالیز آماری نشان داد که بین درجه حرارت در میزان تولید باکتریوسین (قطر هاله عدم رشد) رابطه معنادار وجود ندارد ($P > 0.05$). ولی مطالعه اثر تک فاکتورها توسط نرم افزار نشان داد در درجه حرارت $40^\circ C$ درجه سانتی گراد بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد حاصل می‌گردد. تحقیقات مختلف نشان داده است که بهینه رشد برای انواع پروبیوتیکهای لبنی و غیر لبنی در محدوده $35-30^\circ C$ است و در درجه حرارت‌های بالاتر از آن بقای ارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد. در تحقیق انجام شده توسط Ana Lúcia و همکاران در رابطه با تولید نوشابه آب سیب پروبیوتیک توسط لاکتوباسیلوس کازئی که در محدوده دمایی $10^\circ C$ تا $41^\circ C$ انجام شد، بهترین نتیجه (از نظر بیومس تولیدی و بقای آن) در حرارت $30^\circ C$ حاصل گردید. در ارتباط متقابل PH و درجه حرارت آنها دریافتند که در مقادیر مختلف PH بهترین درجه حرارت رشد در محدوده $30^\circ C$ تا $35^\circ C$ می‌باشد (۱۹). بدیهی است درجه حرارت‌های بسیار پایین از طریق تاثیر بر تبادلات مولکولی و کند کردن انتقال مواد غذایی باعث کندی رشد باکتریها می‌گردند. در مورد پروبیوتیک‌ها نگهداری طولانی مدت در دماهای سردخانه ($4^\circ C$) بتدریج ماندگاری آنها را کاهش می‌دهد و لذا زمان نگهداری همواره محدود است. از سویی دیگر درجه حرارت‌های بالا از طریق تقلیب یا ایجاد دگرگونی در ساختار پروتئینها به رشد میکرو ارگانیسم‌ها آسیب وارد می‌سازد. در خصوص بهینه سازی تولید با استفاده از منابع کربن آنالیز آماری نشان داد که بین انواع منابع

References

- Fullera R. Probiotics in man and animals. A FRC Institute of Food Research, Reading Laboratory, Shinjeld, Reading RG2 9AT. *Journal of Applied Bacteriology* 1989; **66**: 365-378.
- CarmenCollado M, Meriluoto J, Salminen S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International* 2007; **40**(5): 629-636. doi: 10.1016/j.foodres.2006.11.007
- Daly C, Davis R. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agric Food Sci* 1998; **7**(2): 251-265. doi: 10.23986/afsci.72862
- Salminen J S, Ouwehand A, Isolauri E. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 1998; **8**(5-6): 563-572. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00077-6
- Bierbaum G, Sahl H-G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2009; **10**(1): Page: [2-18] Pages: 17. doi: 10.2174/138920109787048616
- Gorbach S L. Lactic acid bacteria and human health. *Annl Med* 1990; **22**(1): 37-41. doi: 10.3109/07853899009147239
- Malmsten M. Antimicrobial Peptides. *Ups J Med Sci* 2014; **119**(2): 199-204. doi: 10.3109/03009734.2014.899278
- Mengfei Peng. *Recent International Journal of Food Microbiology Articles. Microbiological Research* 2014; **170**: 35-36. doi: 10.1016/j.micres.2014.09.004
- Weerapong Woraprayote, Laphaslada P, Amonlaya T. *Kyushu* 2015; **12**: 176-184. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.036
- Mirdamadi S, Tangestani M. Screening and characterization of bacteriocins produced by some Strains of Lactobacillus spp isolated from Iranian Dairy products. *Internet Journal of Nanotechnology* 2011; **3**: 55-69. doi:10.5580/28a1
- Kiaee A, Mozaffar A. Antagonistic effect of lactic bacteria present in yoghurt against pathogenic bacteria. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 2006; **1**: 28-33. doi: 10.18869/acadpub.mlj.9.5.4
- Hoque M Z, Akter F, Hossain K M. Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactobacillus Spp. *Selective Regional Yoghurts* 2015. doi: 10.3923/pjn.2015.67.74
- Kumar A, Rajput G, Dhatwalia V K, Srivastav G. Phytocontent screening of Mucuna seeds and exploit in opposition to pathogenic microbes. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 2015; **3**(9). doi: 10.3844/ojbsci.2015.111.112
- Mukherjee A K, Rai S K. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative Bacillus sp. strain AS-S20-I. *New Biotechnology* 2011; **28**: 182-189. doi: 10.1016/j.nbt.2010.11.003
- Chowdhury A, Nur J, Fakruddin M, Billah M, Morshed Ahmed M. Screening of Lactobacillus SPP. from buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial activity. *J bacterial Parasitol* 2012; **3**: 8. doi: 10.4172/2155-9597.1000156
- Konings WN1, Kok J, Kuipers O P, Poolman B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**(3): 276-282. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00089-8
- Mojgani N, Kahaniyan E, Amelli M. Detection and characterization of bacitracin RN78 produced by lactobacillus acidophilus strain isolated from a cheese sample. *Pajouhesh-Va-Sazandegi* 2005; **71**.
- Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. *Jour. Arch Med Res* 2005; **36**(4): 376-381. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.03.007
- Ana Lúcia F P, Tatiane C M, Sueli R. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus case. *In AGRIS since* 2014; **44**(5): 1276-1283. doi: 10.1016/j.foodres.2010.11.035

Protective effect of zinc on the Alkaline Phosphatase Activity in rats exposed to Arsenic

Ziba Rezvanie Sichanie^{ID}, Seyed Ali Asghar Moshtaghi^{*} ^{ID}

Department of Biochemistry, School of Basic Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

^{*}Corresponding author; E-mail: moshtaghi@pharm.mui.ac.ir

Received: 22 May 2017 Accepted: 18 September 2017 First Published online: 4 July 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):61-67

Abstract

Background: Considering the importance of the alkaline phosphatase enzyme for growth of liver cells and the presence of zinc in this regard the purpose of this project was to evaluate the Protective effect of zinc on the Alkaline Phosphatase Activity in rats exposed to Arsenic.

Methods: In this experimental study, a total of 48 male Wistar rats were randomly allocated into 8 sub-groups and were categorized as two short and long term evaluation: in a short-term period: group 1 control, group 2 received 40 mg/l As sodium, group 3 received 40 mg/l As sodium and zinc simultaneously and group 4 received 40 mg/l Zn. in a long-term period groups group 1 control, group 2 received 20 mg/l As sodium, group 3 received 20 mg/l As sodium and zinc simultaneously and group 4 received 20 mg/l Zn with oral administration. Blood samples were taken over a 30-day and 60-day period and serum enzyme alkaline phosphatase was measured.

Results: Administration of 2 different doses of as sodium decreased the activity of alkaline phosphatase compared to the control group. Moreover, the simultaneous use as sodium with zinc increased the activity of alkaline phosphatase ($P<0/05$).

Conclusion: The arsenate sodium reduced the activity of alkaline phosphatase, and zinc can be able to reduce the toxic effects of arsenate sodium.

Keyword: Arsenic sodium, Alkaline phosphatase, Zinc, Liver.

How to cite this article: Rezvanie Sichanie Z, Moshtaghi S.A.A. [Protective effect of zinc on the Alkaline Phosphatase Activity in rats exposed to Arsenic]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):61-67. Persian.

مقاله پژوهشی

اثر محافظتی عنصر روی بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در موش های صحرایی مسموم شده با آرسنات سدیم

زیبا رضوانی سیجانی^۱، سید علی اصغر مشتاقی^{۲*}

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
* نویسنده مسؤل: ایمیل: moshtaghie@pharm.mui.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۶۱-۶۷

چکیده

زمینه: با توجه به اهمیت آنزیم الکلان فسفاتاز جهت رشد سلول های کبدی و با توجه به وجود عنصر روی در ساختمان این آنزیم و با وجود خاصیت آنتاگونیستی و تاثیر احتمالی آرسنیک بر این فرآیند، هدف اجرای این پروژه منظور گردیده است.

روش کار: تعداد ۴۸ سرموش صحرایی نر از نژاد ویستارد ۸ گروه آزمایشی تقسیم بندی شدند. گروه های تقسیم شده به ترتیب در دوره ی کوتاه مدت شامل گروه های کنترل، آرسنات سدیم به مقدار ۴۰ mg/l، روی به میزان ۴۰ mg/l و ۴۰ mg/l آرسنات سدیم و روی را به صورت همزمان دریافت کردند و در دوره ی بلند مدت شامل گروه کنترل، آرسنات سدیم به مقدار ۲۰ mg/l، روی به میزان ۲۰ mg/l و ۲۰ mg/l آرسنات سدیم و روی به صورت تجویز خوراکی دریافت کردند. و خون گیری بعد از اتمام یک دوره ی ۳۰ و ۶۰ روزه انجام شد و سطح سرمی آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به عملکرد کبد اندازه گیری شد.

یافته ها: بررسی نتایج نشان می دهد که دوز های مختلف آرسنات سدیم باعث کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نسبت به گروه کنترل می شود. همچنین استفاده همزمان آرسنات سدیم - روی باعث افزایش فعالیت این آنزیم می شود.

$(P < 0.05)$

نتیجه گیری: در مجموع می توان گفت در حالی که آرسنات سدیم منجر به کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در کبد می شود، روی می تواند اثرات سمی این عنصر را خنثی کند.

کلید واژه ها: آرسنات سدیم، روی، آلکالین فسفاتاز، کبد

نحوه استناد به این مقاله: رضوانی سیجانی ز، مشتاقی س ع ا. اثر محافظتی عنصر روی بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در موش های صحرایی مسموم شده با آرسنات سدیم. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۶۱-۶۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

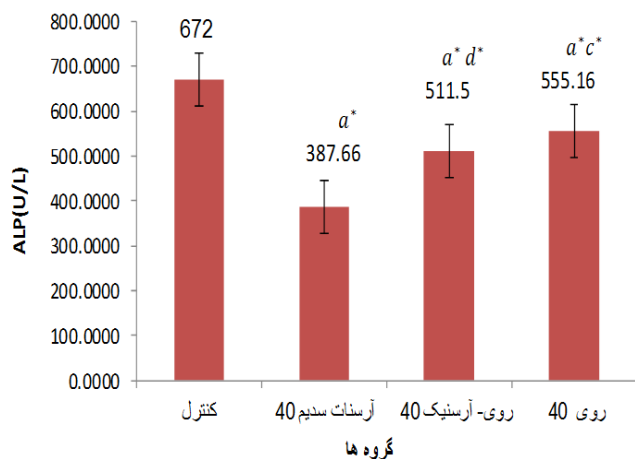
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

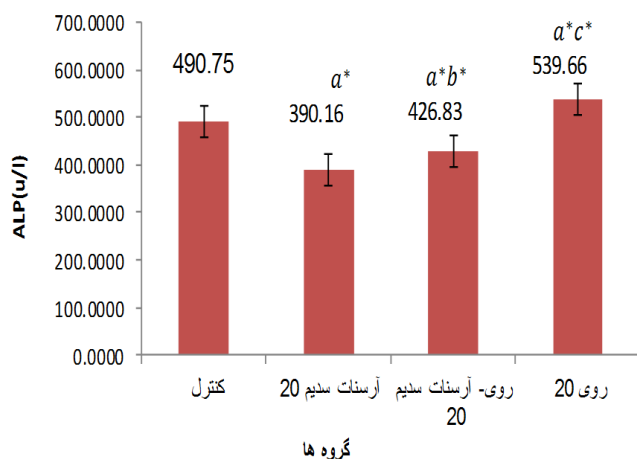
به طور عمده بسیاری از مشکلات بهداشتی کشور های رو به پیشرفت به علت نبودن آب آشامیدنی سالم است. اخیرا آلودگی های ناشی از فلزها به عنوان یک مسئله جدی و شاید خطرناک ترین عامل آلودگی محیطی شناخته شده است. پایداری فلزهای سنگین در محیط، مشکلات ویژه ای را ایجاد می کند (۱). آرسنیک عنصری سمی و یکی از خطرناک ترین آلوده کننده های محیطی است (۲). آرسنیک غیر آلی و ناشی از منابع خاکی در آب های زیر زمینی وجود دارد (۳). مسیرهای جذب آرسنیک در بدن به طور عمده مسیر های تنفسی، گوارشی و پوست می باشد (۴). قسمت اعظم دفع آرسنیک از طریق کلیه ها صورت می گیرد و به میزان جزئی نیز از طریق مدفوع و عروق دفع می شود (۵). آرسنیک بر اندام ها و بافت های مختلف بدن مانند بافت عصبی، کلیوی، قلبی-عروقی، کبدی، تولید مثلی، پوست و غیره اثرات زیانباری را بر جای می گذارد (۶ و ۷). بر اساس مطالعات گذشته نشان داده شده است که مواجهه با آرسنات سدیم سبب بزرگ شدن کبد و افزایش غلظت آنزیم های کبدی از جمله آلکالین فسفاتاز (ALP) می شود (۸). همچنین در معرض قرار گرفتن حیوانات در آب حاوی آرسنات سدیم، سبب می شود که سلول های کبدی از نظر بافتی دچار نکروز شود و فضاهای سینوسی کبدی گسترش یابد (۹ و ۱۰). روی عنصر ضروری بعد از آهن شناخته شده است. روی یک عنصر کمیاب ضروری است که برای ساختار آنزیم های مختلف و عملکرد آن ها لازم است. اهمیت بیولوژیک روی در ارتباط با شرکت این عنصر در ساختمان متالوآنزیم ها است و تا کنون حدود ۷۰ آنزیم شناخته شده اند که در ساختمان آن ها روی به کار رفته است (۱۱). محققین نشان دادند که در هر دو بیماری حاد و مزمن کبدی، کاهش غلظت روی نقش دارد (۱۲). روی دارای یک پتانسیل آنتی اکسیدانی برای غشاهای زیستی است و اثرات محافظتی این عنصر می تواند باعث کاهش تجمع کلآژن در کبد شود و اعمال نقش فیزیولوژیکی حیاتی را در عملکرد سلولی کبد تنظیم کند (۱۳). همچنین محققان گزارش دادند که روی یک اثر محافظتی در برابر فیروز کبدی دارد (۱۴). همچنین مطالعات گذشته نشان داد که در حقیقت روی یکی از آنتاگونیست هایی است که سبب کاهش فعالیت فلزات سنگین می شود (۱۴). همچنین مصرف آرسنات سدیم و روی به صورت هم زمان سبب تعدیل اثرات سمی آرسنات سدیم بر غلظت و اثر محافظتی روی بر سمیت کبدی ناشی از آرسنات سدیم شده است (۱۵). هدف مطالعه حاضر بررسی نقش محافظتی روی در جلوگیری از سمیت آرسنات سدیم بر آنزیم آلکالین فسفاتاز در کبد رت های نر نژاد ویستار می باشد و چون این آنزیم در ارتباط با عنصر روی است و روی جزء لاینفک این آنزیم می باشد، علت انتخاب این آنزیم در این پروژه می باشد.

روش کار

مواد لازم از کارخانه ای اکراس (Acros Organics) ساخت کشور آمریکا تهیه گردیدند و همگی از نوع خالص آزمایشگاهی بودند. کیت آزمایشگاهی جهت اندازه گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز از شرکت پارس آزمون تهیه شد. در این پروژه از ۴۸ سر موش های صحرایی نر بالغ با نام علمی *Ratus Norvegicus* از نژاد ویستار با میانگین وزنی 50 ± 200 گرم و ۹۰-۱۱۰ روز سن استفاده شد. این حیوانات از مرکز آزمایشگاهی موسسه رازی کرج خریداری شدند و پس از انتقال به لانه حیوانات دانشگاه فلاورجان، به منظور جلوگیری از مبتلا شدن حیوانات به عفونت، قبل از انتقال به قفس های مربوطه، کلیه قفس ها پس از شستشو با محلول ۵ درصد فنول ضدعفونی گردیدند. موش ها در اتاقی با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. رت ها از غذای فشرده شده ساخت کارخانه بهپرور و آب تصفیه شده لوله کشی شهر تغذیه گردیدند. برای آزمایشات *In vivo* در دوره ی کوتاه مدت، حیوانات به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. یک گروه کنترل که روزانه تحت شرایط استاندارد از قبیل آب و غذا قرار گرفتند و گروه دوم ۴۰ میلی گرم آرسنات سدیم و گروه سوم به صورت همزمان ۴۰ میلی گرم آرسنات سدیم و ۴۰ میلی گرم کلرید روی و گروه چهارم ۴۰ میلی گرم کلرید روی را به مدت ۳۰ روز به صورت خوراکی در ۳۵۰ سی سی آب مقطر حل گردیده، دریافت کردند. در دوره ی بلند مدت، حیوانات به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. یک گروه کنترل که روزانه تحت شرایط استاندارد از قبیل آب و غذا قرار گرفتند و گروه دوم ۲۰ میلی گرم بر لیتر آرسنات سدیم و یک گروه دیگر به صورت همزمان ۲۰ میلی گرم آرسنات سدیم و ۲۰ میلی گرم کلرید روی و یک گروه دیگر ۲۰ میلی گرم کلرید روی را به مدت ۶۰ روز به صورت خوراکی در ۳۵۰ سی سی آب مقطر حل گردیده، دریافت کردند. در عمل خون گیری، ابتدا رت ها با استفاده از تزریق مخلوطی کتامین ۷/۰ درصد و زایلازین ۰/۰۵ درصد بیهوش شده و بلافاصله عمل خونگیری مستقیم از قلب با استفاده از سرنگ ۱۰ سی سی انجام گرفت. بعد از مدتی نمونه ها با سرعت ۳۰۰۰ r.p.m به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و جدا سازی شد. غلظت آلکالین فسفاتاز موجود در سرم با استفاده از کیت آنزیمی تعیین گردید. این کیت ساخت کارخانه ی پارس آزمون است روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) و اساس آزمایش متکی بر اندازه گیری فسفات حاصل توسط آنزیم آلکالین فسفاتاز است. آنزیم آلکالین فسفاتاز، p - نیترو فیل فسفات موجود در سرم را به فسفات و نیتروفل تجزیه می کند. در اینجا اصول اندازه گیری آلکالین فسفاتاز مختصرا



نمودار ۱: اثرات خوراکی آرسنات سدیم (۴۰ میلی گرم بر لیتر) و یا کلرید روی (۴۰ میلی گرم بر لیتر) به مدت ۳۰ روز بر غلظت آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به عملکرد کبد نشان داده شده اند. (One way ANOVA, LSD) برای ۱۷ نمونه $\text{Mean} \pm \text{SE}$ ارقام به صورت a: تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل ($p < 0.05$). C: تفاوت معنی دار نسبت به گروه روی - آرسنات سدیم ($p < 0.05$). d: تفاوت معنی دار نسبت به گروه روی ($p < 0.05$).



نمودار ۲: اثرات خوراکی آرسنات سدیم (۲۰ میلی گرم بر لیتر) و یا کلرید روی (۲۰ میلی گرم بر لیتر) به مدت ۶۰ روز بر غلظت آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به عملکرد کبد نشان داده شده اند. (One way ANOVA, LSD) برای ۱۷ نمونه $\text{Mean} \pm \text{SE}$ ارقام به صورت a: تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل ($p < 0.05$). b: تفاوت معنی دار نسبت به گروه آرسنات سدیم ۲۰ ($p < 0.05$). C: تفاوت معنی دار نسبت به گروه روی - آرسنات سدیم ($p < 0.05$).

بحث

در حال حاضر به خوبی مشخص شده است که آرسنیک سبب اختلالات وسیعی در فعالیت های بدن می شود (۹-۱۲). داده های حاصل از تحقیقات قبلی دانشمندان نشان داده است که این عنصر در فعالیت های کبد موش های آزمایشگاهی تاثیر گذار بوده است (۱۸،۶۸) و آسیب های جدی به عملکرد کبد وارد می آورد (۱۹ و ۲۰). داده های ارائه شده در این مقاله نشان می دهند که اختلالات کبدی در موش هایی که در معرض دوزهای مختلف آرسنیک قرار گرفته اند، ممکن است رخ دهد. مطالعات اخیر نشان داده است که قرار گرفتن در معرض آرسنیک، اغلب از طریق آب

بیان می شود. آزمایشات بیوشیمیایی توسط دستگاه اتوآنالیزر مدل هیتاچی ۹۰۲ انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS صورت گرفت. برای بررسی تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) میانگین ها در بین گروه ها به لحاظ آماری از آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) استفاده گردید و برای بررسی تفاوت های معنی دار هر یک از میانگین ها نسبت به هم از آزمون تعقیبی (least significant difference LSD) استفاده شد. برای تهیه هیستوگرام ها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

جدول ۱: روش اندازه گیری آلکالین فسفاتاز

نمونه یا استاندارد	بلاک	تک محلوله
نمونه ۲۰ میکرولیتر	-	نمونه
۱۰۰۰ میکرولیتر	۱۰۰۰ میکرولیتر	محلول مخلوط شده

پس از مخلوط نمودن، مقدار جذب نوری را بعد از ۱ دقیقه قرائت نموده، کرومومتر را به کار انداخته و دقیقاً پس از ۱،۲ و ۳ دقیقه جذب نوری را در طول موج ۴۰۵ نانومتر مجدداً خوانده می شود و سپس اختلاف جذب نوری را از دقیقه قبل تعیین می نمایم

یافته ها

پس از انجام آنالیز های مربوطه، میزان تغییرات غلظت آلکالین فسفاتاز در دوره ی کوتاه مدت و بلند مدت، نسبت به گروه شاهد و گروه های دریافت کننده ی آرسنات سدیم توام با کلرید روی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همان طور که از نمودار ۱ برمی آید در دوره ی کوتاه مدت، در دوز ۴۰ میلی گرم بر لیتر آرسنات سدیم سبب کاهش میزان آلکالین فسفاتاز در سرم خون موش ها نسبت به گروه کنترل شده است. که این کاهش از نظر آماری معنی دار است. کلرید روی در مقایسه با گروه کنترل سبب کاهش ۱۶ درصدی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز شده است که از لحاظ آماری معنی دار بوده است ($P < 0.05$). همین طور تاثیر اثرات محافظتی روی بر مسمومیت آرسنات سدیم بر آنزیم آلکالین فسفاتاز و تاثیر توام روی و آرسنات سدیم بر پارامتر مذکور مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج نشان می دهد که تجویز خوراکی روی توام با آرسنات سدیم در دوز ۴۰ میلی گرم بر لیتر در دوره ی ۳۰ روزه سبب کاهش ۲۳ درصدی غلظت آلکالین فسفاتاز نسبت به گروه کنترل شده است (نمودار ۱) ($P < 0.05$). همان طور که از نمودار ۲ برمی آید در دوره ی بلند مدت، دوز ۲۰ میلی گرم بر لیتر آرسنات سدیم سبب کاهش میزان آلکالین فسفاتاز در سرم خون موش ها نسبت به گروه کنترل شده است. که این کاهش از لحاظ آماری معنی دار است. کلرید روی در مقایسه با گروه کنترل در دوره ی بلند مدت سبب افزایش ۱۵ درصدی میزان آلکالین فسفاتاز سرم شده است. تجویز خوراکی روی توام با آرسنات سدیم در دوز ۲۰ میلی گرم بر لیتر در دوره ی ۶۰ روزه سبب کاهش ۲۳ درصدی غلظت آلکالین فسفاتاز سرم نسبت به گروه کنترل شده است (نمودار ۲).

یکپارچگی اندامک های سلولی مانند شبکه آندوپلاسمی و سیستم حمل و نقل غشایی و فرایندهای غشایی ایجاد شده و سبب کاهش فعالیت های گلوکوتایون پراکسیداز، گلوکوتایون ردوکتاز و کاتالاز در کبد (به عنوان نتیجه در معرض قرار گرفتن آرسنات سدیم) گردد (۱۹ و ۲۰). روی همچنین نقش مهمی در سم زدایی فلزات و ایجاد ثبات در غشاء و فرایندهای غشایی بازی می کند (۳۱ و ۳۲). در این مطالعه تجویز خوراکی روی - آرسنات سدیم و روی منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم کاهش یافته شده است که احتمالاً نشان می دهد که روی اثر محافظتی خود را بر روی آرسنات سدیم گذاشته و مانع از تخریب بافت کبد توسط آرسنات سدیم شده است. مطابق با نتایج ما، کومار و همکاران نشان دادند که تجویز خوراکی همزمان آرسنیک با دوز ۲۲۷ میلی گرم بر لیتر و روی با دوز ۲۲۷ میلی گرم بر لیتر به مدت ۳ ماه به رت ها، سبب تعدیل اثرات سمی آرسنات سدیم بر غلظت سرمی آنزیم آلکالین فسفاتاز و نقش محافظتی روی بر سمیت آن ناشی از آرسنات سدیم شده است (۱۵). همچنین مطابق با نتایج این پروژه روی به عنوان یک آنتی اکسیدان توانایی مقابله با این مکانیسم را داشته و سبب بهبود فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می گردد (۱۳).

نتیجه گیری

آرسنات سدیم یک آلاینده زیست محیطی است که سمیت آن به طور وسیعی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. همچنین بر اساس مطالعه کنونی، در مجموع می توان گفت که آرسنات سدیم، بالاخص در دوز های بالا، دارای اثر سمی بوده و باعث تغییر در سطح سرمی آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به کبد می گردد. اما این اثر سمی آرسنیک با تجویز خوراکی روی کاهش می یابد.

قدردانی

لازم است از آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و همچنین از افرادی که در این مطالعه مساعدت و همکاری به عمل آوردند، قدردانی نمائیم.

References

1. Hughes M F, Beck B D, Chen Y, Lewis A S, Thomas D J. Arsenic exposure and toxicology. *Toxicological Sciences* 2011; **123**(2): 305-332. doi: 10.1093/toxsci/kfr184.
2. Manzano R, Penalosa J, Esteban E. Arsenic Accumulation and Tolerance of *Cytisus scoparius* Under Controlled Conditions. *Springer Science* 2013; **10**: 1363-1366. doi: 10.1007/s11270-012-1363-6.
3. Kahle A. Drinking water Arsenic. *Environmental Engineering Specialist* 2014; **9**: 2004-2006. doi: 10.1016/j.envres.2005.03.009.
4. Mohamed S, Elshal M, Kumosani T, Ahmed Y, Almulaiky Y, et al. Heavy metal accumulation with molecular and pathological perturbations in liver of *Variola louti* from the Jeddah Coast of Red Sea. *Environmental Research and public health* 2016; **13**: 1-11. doi: 10.3390/ijerph13030342.

آشامیدنی آلوده سبب ایجاد بسیاری از بیماری ها می شود (۲۱). آرسنات سدیم به عنوان یک عنصرسمی در محیط زیست یافت می شود. انسان ها و حیوانات در معرض این فلز قرار می گیرند و مواجهه با آن باعث وارد شدن آسیب به کبد می شود. همچنین گزارش شده است که با افزایش سطوح دوز آرسنات سدیم، آسیب های وارده به کبد بیشتر می شود (۲۲). نایر و همکاران نیز طی بررسی هیستوپاتولوژیک کبد متعاقب تجویز آرسنات سدیم در موش صحرایی نشان دادند که این عنصر باعث به هم ریختگی ساختار سلول های کبدی، نکروز کانونی سلول ها به همراه پیکنوز شدن هسته و نیز نفوذ لکوسیت ها می گردد (۲۳). همچنین نشان داده شده است که مواجهه با آرسنات سدیم باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سرم می شود (۲۴). افزایش فعالیت این آنزیم در دوزهای مختلف آرسنات سدیم ممکن است به این دلیل باشد که آرسنات سدیم باعث افزایش فعالیت سستز آن شده که نشان دهندهی نشت سلولی و از دست دادن غشاء سلولهای کبدی است (۲۴-۲۸). ولی در این تحقیق آرسنات سدیم سبب کاهش فعالیت این آنزیم شده است. به گفتهی محققان، فعالیت سرمی آلکالین فسفاتاز متناسب با بافت است (۳۰). در نتیجه می توان گفت در این مقاله آرسنات سدیم با آسیب رساندن به بافت کبدی سبب کاهش فعالیت این آنزیم شده است. همچنین محققان گزارش دادند که افزایش آلکالین فسفاتاز به عنوان یک نتیجه از تغییرات متابولیک در کبد می باشد که پس از تجویز سم، هپاتیت، و سرطان کبد گزارش شده است (۲۹). ولی هومتسو و همکاران نشان دادند که مواجهه با آرسنات سدیم باعث کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در کبد ماهی شده است که این کاهش در غلظت های پایین تر آرسنیک معنی دار نبوده است (۱۸). و این نتایج مشابه نتایج ما در این پروژه بوده است. به گفتهی محققین تنوع فعالیت های آنزیمی اعم از کاهش و افزایش در فلزات سنگین، به دلیل افزایش نفوذ پذیری سلول و همچنین اثر مستقیم آرسنیک بر بافت است، بنابراین، افزایش یا کاهش قابل توجهی از آنزیم ها را می توان به افزایش سطح آرسنیک به بافت نسبت داد (۲۰). در نتیجه، در این تحقیق آرسنات سدیم می تواند سبب مهار آنزیم آلکالین فسفاتاز شود و فعالیت آن را کاهش دهد. همچنین، کاهش فعالیت آن سبب اختلال در ساختار و

5. Wu M M, Chiou H Y, Wang T W, Hsueh Y M, Wang I H, Chen C J, et al. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environmental Health Perspectives* 2001; **109**(10): 10-11.
6. Hughes M F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology letters* 2002; **133**(1): 1-16. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00084-X
7. RAO K J, Devaraju K, SuJatha S. Impact of sodium arsenate on selected enzymes and histopathological studies in albino mice. *J of pharmacy and biological science* 2010; **1**(3): 344-354.
8. Islam K, Haque A, Karim R, Fajol A, Hossain E, Salam K A, et al. Dose-response relationship between arsenic exposure and the serum enzymes for liver function tests in the individuals exposed to arsenic: a cross sectional study in Bangladesh. *Environ Health* 2011; **10**(64): 1-11. doi: 10.1186/1476-069X-10-64.
9. Ferzand R, Gadahi J A, Saleha S, Ali Q. Histological and haematological disturbance caused by arsenic toxicity in mice model. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 2008; **11**(11): 1405-1413. doi: 3923/pjbs.2008.1405.1413.
10. Matović V, Buha A, Bulat Z, Đukić-Ćosić D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 2011; **62**(1): 65-75. doi: 10.2478/10004-1254-62-2011-2075.
11. Stamoulis I, Kouraklis G, Theocharis S. Zinc and the liver: an active interaction. *Digestive diseases and sciences* 2007; **52**(7): 1595-1612. doi: 10.1007/s10620-006-9462-0.
12. Sidhu P, Garg M, Dhawan D. Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats. *Nutr Hosp* 2004; **19**(6): 341-347. doi: 10.1081/DCT-52551.
13. Powell S R. The antioxidant properties of zinc. *J Nut* 2000; **130**: 14475-14545. doi: 10.1163/2210-7886/ASC-14475.
14. Kumar A, Malhotra A, Nair P, Garg M, Dhawan D K. Protective role of zinc in ameliorating arsenic-induced oxidative stress and histological changes in rat liver. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2010; **29**(2): 91-100. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.06.854
15. Eze E, Dawud F, Zainab A, Jimoh A, Malgwi I, Isa A. Preliminary studies of effects of vitamin C and zinc on some liver enzymes in alloxan-induced diabetic wistar rats. *Asian J Med Sci* 2012; **4**(1): 17-22. doi: 10.18869/2016.164.
16. Mazumder D G. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. *Toxicology and applied pharmacology* 2005; **206**(2): 169-175. doi: 10.1016/j.taap.2004.08.025.
17. Humtsoe N, Davoodi R, Kulkarni B, Chavan B. Effect of arsenic on the enzymes of the rohu carp *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Raffles Bull Zool* 2007; **14**: 17-19. doi: 10.3750/AIP2004.34.2.08.
18. Barchowsky A, Cartwright I L, Reichard J F, Futscher B W, Lantz R C. Arsenic toxicology: translating between experimental models and human pathology. *Environmental health perspectives* 2011; **119**(10): 1356-1363. doi: 10.1289/ehp.1103441
19. El-Demerdash F M, Yousef M I, Radwan F M. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology* 2009; **47**(1): 249-254. doi: 10.1016/j.fct.2008.11.013.
20. Mallick P, Mallick J C, Guha B, Khuda-Bukhs A. Ameliorating effect of microdoses of a potentized homeopathic drug, *Arsenicum Album*, on arsenic-induced toxicity in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2003; **3**(1): 1-7. doi: 10.1186/1472-6882-3-7.
21. Muthumani M, Prabu S M. Silibinin potentially protects arsenic-induced oxidative hepatic dysfunction in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2012; **22**(4): 277-288. doi: 10.3109/15376516.2011.647113.
22. Nair S B, Jhala D D, Chinoy N G. Beneficial effects of certain antidotes in mitigating fluoride and/or arsenic induced hepatotoxicity in mice. *Fluoride* 2004; **37**: 60-70. doi: 10.1016/j.fct.2007.11.009.
23. Balasubramanian J, kumar A. Effect of sodium arsenite on liver function related enzymes of cat fish *heteropneustes fossilis* and its chelation zeolite. *Ecotoxicol. Environ. Contam* 2013; **2**(8): 53-58. doi: 10.5132/eec.2013.02.008
24. Gaskill C, Miller L M, Mattoon J, Hoffmann W, Burton S A, Gelens H C, et al. Liver histopathology and liver and serum alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities in epileptic dogs receiving phenobarbital. *Veterinary Pathology Online* 2005; **42**(2): 147-160. doi: 10.1354/vp.42-2-147
25. Banerjee P, Bhattacharyya S S, Bhattacharjee N, Pathak S, Boujedaini N, Belon P, et al. Ascorbic acid combats arsenic-induced oxidative stress in mice liver. *Ecotoxicology and environmental safety* 2009; **72**(2): 639-649. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.07.005.
26. Vutukuru S S, Prabhath N A, Raghavender M, Yerramilli A. Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. *International journal of environmental research and public health* 2007; **4**(3): 224-227. doi: 10.3390/ijerph2007030005.
27. Chalasani N, Aljadhey H, Kesterson J, Murray M D, Hall S D. Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004; **126**(5): 1287-1292. doi: 10.1053/j.gastro.2004.02.015

28. Karmakar R, Mondal T, Saha B, Ban D K, Dey B, Dastidar P G, et al. Arsenic induced Biochemical perturbation in Swiss Albino Mice and Cytoprotective activities of Curcumin. *International Journal of Environmental Sciences* 2011; **2**(1): 228-238. doi: 10.14419/ijpt.v2i2.3072.
29. Muthumani M, Prabu S M. Silibinin potentially protects arsenic-induced oxidative hepatic dysfunction in rats. *Toxicology mechanisms and methods* 2012; **22**(4): 277-288. doi: 10.3109/15376516.2011.647113.
30. Fernandez J, Kidney A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Veterinary Clinical Pathology* 2007; **36**(3): 223-233. doi: 10.1111/j.1939-165X.2007.tb00216.x
31. Vallee B L, Falchuk K H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Rev* 1993; **73**(1): 79-118. doi: 10.1006/bbrc.1994.1607.
32. Bettger W J, O'Dell B L. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1993; **4**(4): 192-194. doi: 10.1016/0955-2863(93)90052-X.

The effect of anaerobic exercise with melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion

Hamed Alizadeh Pahlavani^{1*} , Hamid Rajabi², Mohammad Nabiuni³, Pezhman Motamedi², Neda Khaledi²

¹Department of Physical Education and Sport Sciences, Behbahan School of Medical Sciences, Behbahan, Iran

²Department of Physical Education and Sport Sciences, School of Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

³Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: Alizadehh76@yahoo.com

Received: 12 August 2017 Accepted: 4 November 2017 First Published online: 4 July 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):68-77

Abstract

Background: The present research aims to examine the effect of anaerobic exercise with melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion by isoprenaline.

Methods: In the present experimental study, 28 male Wistar rats weighing approximately 200-250 g with two to three months old were divided into five groups: pilot (n=14), control (n=4), melatonin (n=4), anaerobic (n=4) and melatonin anaerobic (n=4). Pilot group were divided into two groups, isoperalin (n=7) and normal (n=7): isoperalin group injected isoprenaline with dose of 150 and 125 mg/kg BW with 24 hours in two consecutive days; and normal group has no injection. Then more fibros level was confirmed in isopernalin into normal groups used Masson-trichrom tanique. In the following Rats in melatonin group were gavaged every day for one month using a dose of 10 mg/kg BW. Meanwhile, rats in anaerobic group and melatonin anaerobic group were exposed training course with frequency of three times weekly for one month. But control group were injected only with isopernalin in the end of one month. Finally, rats were sacrificed after confirmation of infarct and expressions of bax and bcl2 gene were studied by real-time method.

Results: Melatonin treatment and anaerobic training have negligible effect on Bax and Bcl-2 gene expression. In the other hand, anaerobic exercise with consuming melatonin can decrease and increase Bax and Bcl-2 gene expression respectively and show significant effect, compared to treatment with melatonin alone.

Conclusion: The anaerobic exercise with consuming melatonin into consuming melatonin alone can reduce inactive induced-Infarction level.

Keyword: Apoptosis, Anaerobic Exercise, Melatonin, Reperfusion, Bax, Bcl2.

How to cite this article: Alizadeh Pahlavani H, Rajabi H, Nabiuni M, Motamedi P, Khaledi N. [The effect of anaerobic exercise with melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):68-77. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای BAX و BCL2 میوکارد رت پس از ایسکمی ریپرفیوژن

حامد علی‌زاده پهلوانی^{۱*}، حمید رجبی^۲، محمد نبیونی^۲، پژمان معتمدی^۱، ندا خالدی^۲

گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم پزشکی بهبهان، بهبهان، ایران
 گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
 گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
 * نویسنده مسئول: ایمیل: Alizadehh76@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۶۸-۷۷

چکیده

زمینه: هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای BAX و BCL2 میوکارد رت پس از ایسکمی ریپرفیوژن می‌باشد.

روش کار: ۲۸ رت صحرایی نر و بیستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۰۰-۲۵۰ گرم به پنج گروه، پیلوت (n=۱۴)، کنترل (n=۴)، ملاتونین (n=۴)، تمرین بی‌هوازی (n=۴) و تمرین بی‌هوازی و ملاتونین (n=۴) تقسیم شدند. گروه پیلوت به دو گروه ایزوپرنالین (ایسکمی ریپرفیوژن) و سالم تقسیم گردیدند. گروه ایزوپرنالین در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند؛ و گروه سالم هیچگونه تیماری نداشتند. سپس با رنگ‌آمیزی تری کروماتون میزان فیروز بیشتر در گروه ایزوپرنالین نسبت به گروه سالم تأیید شد. گروه‌های ملاتونین یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند؛ و گروه‌های تمرین بی‌هوازی و تمرین بی‌هوازی و ملاتونین تحت تمرین یک ماهه با تواتر سه جلسه در هفته روی تردمیل قرار گرفتند. اما گروه کنترل در پایان یک ماه فقط تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند. در نهایت رت‌ها تشریح شدند و اندازه‌گیری بیان ژن bax و bcl2 به روش ریل تایم انجام شد. نتایج تحقیق با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و روش آماری تی مستقل، تحلیل واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی با نرم افزار spss تحلیل شد.

یافته‌ها: تیمار ملاتونین و تمرین بی‌هوازی به تنهایی بر بیان ژن bax و bcl2 تأثیر ناچیزی دارد. اما تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین نیز می‌تواند بیان ژن BAX و BCL2 را به ترتیب کاهش و افزایش دهند؛ و نسبت به تیمار ملاتونین به تنهایی تأثیر معنی‌داری نشان دهند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین نسبت به مصرف ملاتونین به تنهایی می‌تواند از میزان حجم سکنه میوکارد احتمالی ناشی از بی‌حرکی بکاهد.

کلید واژه‌ها: آپوپتوز، تمرین بی‌هوازی، ملاتونین، ریپرفیوژن، BAX، BCL2.

نحوه استناد به این مقاله: علی‌زاده پهلوانی ح، رجبی ح، نبیونی م، معتمدی پ، خالدی ن. تأثیر تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای BAX و BCL2 میوکارد رت پس از ایسکمی ریپرفیوژن. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۶۸-۷۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله به 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

قبل از سال ۱۹۰۰ بیماری‌های عفونی و سوء تغذیه شایع‌ترین علل مرگ در جهان محسوب می‌شدند؛ اما در حال حاضر بیماری‌های قلبی عروقی شایع‌ترین علت مرگ در بسیاری از نقاط جهان هستند. این تغییر که به آن گذار اپیدمیولوژیک اطلاق می‌شود ناشی از صنعتی شدن، شهرنشینی و تغییر سبک زندگی است که در همه نقاط جهان و در میان همه نژادها، گروه‌های قومی و فرهنگ‌ها در حال رخ دادن است. اگر چنین وضعیتی به همین طریق ادامه یابد، میزان مرگ و میر با توجه به سن در سال‌های آینده می‌تواند افزایش یابد. طبق گزارش‌های پژوهشی تجمع لیوپروتئین‌ها، آسیب اندوتلیوم و التهاب از جمله فرایندهای متعددی هستند که در شروع و پیشرفت یکی از مهمترین عوارض قلبی عروقی یعنی آترواسکلروز سهم می‌باشند (۱).

از طرفی هیپوکسی یا کمبود اکسیژن یکی از علل آسیب‌های سلول عضله قلب، و در نهایت مرگ برنامه ریزی شده سلول قلبی به نام آپوپتوز است؛ به طوری که سلول‌ها و نیز میتوکندری‌های یک ناحیه یکپارچگی غشاء خود را از دست می‌دهند و در نتیجه مواد داخل سلولی مانند پروتئین‌های پیش آپوپتوزی آزاد می‌شوند که سبب بروز واکنش‌های التهابی و تشدید آسیب اولیه می‌گردند. در مقابل پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی می‌توانند از طریق فعالیت آنتی آپوپتوزی و تأثیر بر مرحله آبشار کاسپازی از مرگ سلولی ایجاد شده توسط محرک‌ها بکاهند. از این رو پروتئین پیش-آپوپتوزی Bax و پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2 از جمله مهمترین پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز هستند و به همین سبب از نسبت آنها به عنوان شاخصی برای کاهش یا افزایش مرگ سلولی استفاده می‌شود. از این رو هر عاملی که بتواند نسبت Bcl-2 به Bax را افزایش دهد، می‌تواند در کاهش آپوپتوز مؤثر واقع شود (۲).

به هر حال عوامل متعددی می‌توانند از شدت ضایعه عروق کرونری و سپس آپوپتوز میوکارد بکاهند که مهمترین آنها فعالیت بدنی و مصرف دارو می‌باشد. برای مثال خطر گسترش بیماری شریان کرونری در بزرگسالان آماده یا فعال در مقایسه به افراد غیرفعال ۳۰ تا ۴۰٪ کمتر است (۲). همچنین مطالعه‌ای دیگر نشان داد تمرین هوازی سبب افزایش فاکتورهای آنتی آپوپتوزی نظیر Bcl2 و کاهش فاکتورهای آپوپتوزی نظیر Bad در میوکارد می‌شود (۳). بنابراین به نظر می‌رسد یکی از دلایل احتمالی فواید ورزشی جهت محافظت قلبی، کاهش مارکرهای آپوپتوزی نظیر Bax و Bad و همچنین افزایش مارکرهای آنتی آپوپتوزی نظیر Bcl2 در سلول‌های میوکاردی است. در این راستا مطالعه‌ای نشان داد فعالیت ورزشی افزایش نسبت Bax به Bcl2، آپوپتوز و تغییر ساختار قلبی رت‌های ناشی از پیری را کاهش می‌دهد (۴). مطالعه دیگر نشان داد نسبت Bcl2 به Bax در گروه تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل و تمرین حاد بیشتر است (۵). در نهایت تحقیقی ذکر

کرد تمرین ورزشی بیان پروتئین‌های حفاظتی قلب نظیر Bcl2 و HSP72 را در رت‌های فشار خونی افزایش می‌دهد (۶). از طرف دیگر درمان دارویی بلند مدت شامل داروهای مسدود کننده بتا، ملاتونین، آسپرین، پلاویکس، وارفارین با استاتین مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷). مصرف این مواد بیشتر به علت نقش گشادکنندگی عروق توسط آنها می‌باشد؛ همچنین وقوع سکته در ابتدای صبح به دلیل کاهش ترشح ملاتونین در بدن گزارش شده است. در تأیید این مطلب انسان‌ها با دریافت خوراکی ملاتونین سبب کاهش فشار خون در نمونه‌های دارای فشار طبیعی می‌شوند. همچنین گزارش شده است سطوح ملاتونین در افراد مبتلا به سکته و بیماری‌های قلبی و عروقی کاهش می‌یابد. در نهایت این یافته که گیرنده‌های ملاتونین در شریان انسان‌ها وجود دارد، بیانگر نقش مستقیم این هورمون در کنترل موضعی قطر عروق خونی است (۸). ضمناً مطالعات جدید به ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی ملاتونین اشاره کرده‌اند. در این راستا مطالعه‌ای نشان داد ملاتونین نسبت مصرف اکسیژن میتوکندری، فعالیت کمپلکس I و II میتوکندری، تولید پراکسید هیدروژن، سطح لیپید پراکسیداز، مقدار کاردیولیپین و اکسیداسیون کاردیولیپین را کاهش می‌دهد (۹). تحقیق دیگر ذکر کرد ملاتونین دارای ویژگی محافظتی قلبی از طریق پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد به طور مستقیم و از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی خود به طور غیرمستقیم است. تحقیقی در این راستا نشان داد که تجویز ۱۰ میلی گرم ملاتونین اثرات معنی‌دار محافظتی بر انفارکتوس ناشی از ایزوپروترونول با تنظیم فعالیت آنتی اکسیدانی آگروژنیک دارد (۱۰). این تحقیق در نهایت ذکر کرد ملاتونین نشانگرهای آپوپتوزی نظیر Bax را کاهش و Bcl2 را افزایش می‌دهد (۱۱). در مجموع به نظر می‌رسد برنامه ورزشی منظم و مصرف ملاتونین، می‌تواند ظرفیت بی‌هوازی و آنتی اکسیدانی بیماران کرونری را بهبود بخشند و همچنین بر کاهش مارکرهای آپوپتوزی تأثیرگذار باشند. حال با توجه به اینکه برخی افراد مستعد به انفارکتوس میوکارد هستند و وقت کافی برای تمرین منظم ندارند آیا این افراد می‌توانند با افزایش شدت تمرین و کاهش زمان از طریق تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین از وقوع انفارکتوس احتمالی بکاهند. از این رو پژوهش حاضر سعی دارد تا تأثیر تمرین ورزشی بی‌هوازی با مصرف ملاتونین را بر نشانگرهای بیان ژن bax و bcl2 به منظور کاهش میزان آپوپتوز در رت‌های تحت ایسکمی ریپرفیوژن بررسی کند.

روش کار

در این مطالعه تجربی ۲۸ رت صحرایی نر ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۰۰-۲۵۰ گرم به پنج گروه، پایلوت (n=۱۴)، کنترل (n=۴)، ملاتونین (n=۴)، تمرین بی‌هوازی (n=۴) و تمرین

محلول مایع اضافه گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه محلول رویی پس از سانتریفیوژ برداشته شد و به همان اندازه ایزوپروپانول (از شرکت مرک آلمان با کد ۱۰۹۶۳۴) به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها پس از یک شب در فریزر منفی ۸۰ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب ایجاد شده در ته میکروتیوب بوسیله الکل ۷۵٪ به مقدار یک میلی لیتر به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت ۳۳ میکرولیتر آب تثبیت کننده RNA به رسوب در دمای ۵۵ تا ۶۰ اضافه شد تا RNA در آب حل شود. تهیه cDNA با استفاده از پروتکل کیت ویواتیس با کد RTPL12 از کشور مالزی انجام گردید؛ ضمناً پرایمرهای بتا اکینین (فوروارد CTAAGGCCAACCGTGAAGAGATG و ریورز TGGTACGACCAGAGGCATACAG)، bax (فوروارد AATTGGCGATGAAGTGGACAAC و ریورز AGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC) و bcl2 (فوروارد GAGGATTGTGGCCTTCTTTG و ریورز CATGCTGGGGCCATATAGTT) با نرم افزار Primer3 طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده سازی Real-time

به منظور آماده‌سازی مواد ریل تایم، ۴ لاند cDNA از هر گروه تحقیق به چاهک‌های دستگاه ریل تایم ریخته شد؛ سپس ۶ لاند از محلول ماستر میکس (یک لاند پرایمر فوروارد و ریورز و ۵ لاند سایبر گرین شرکت یکتا تجهیز با کد YT2551) به آن اضافه گردید. در ادامه دستگاه ریل تایم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشته شدن اولیه)، ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشته شدن ثانویه)، ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد (اتصال پرایمرها) و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (تکثیر) راه‌اندازی شد. واکنش از مرحله دوم به بعد برای ۴۰ سیکل تکرار شد. Ct های مربوط به واکنش توسط نرم افزار دستگاه استخراج و ثبت شد.

یافته‌ها

نتایج چند برابری ژن‌های bax و bcl2 نشان داد که میزان بیان ژن bax در گروه ملاتونین، بی‌هوای و بی‌هوای ملاتونین نسبت به ایسکمی به ترتیب ۱/۳۵، ۰/۹ و ۰/۴۱ برابر شده است؛ در حالی که بیان ژن bcl2 در گروه ملاتونین، بی‌هوای و بی‌هوای ملاتونین به ترتیب ۱/۳۲، ۲/۶۵ و ۳/۹۶ برابر شده است (شکل ۲). این یافته‌ها نشان دادند که مصرف ملاتونین در طول ۴ هفته چندان تغییری در بیان ژن‌های bax و bcl2 ایجاد نکرده است، اما تمرین بی‌هوای میزان بیان bax و bcl2 را کاهش و افزایش داده است که

بی‌هوای و ملاتونین ($n=4$) تقسیم شدند. گروه پایلوت به دو گروه ایزوپرنالین (ایسکمی ریپرفیوژن) و سالم تقسیم شد. گروه ایزوپرنالین (از شرکت سیگما با کد I5627) در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند؛^{۱۲} (۱۲) و گروه سالم هیچگونه تیماری نداشتند. در ادامه با رنگ آمیزی تری کروماتون میزان فیروز بیشتر در گروه ایزوپرنالین نسبت به گروه سالم تأیید شد. گروه‌های ملاتونین (شرکت سیگما با کد M5250) یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند؛ و گروه‌های تمرین بی‌هوای و تمرین بی‌هوای ملاتونین پس از آشنایی یک هفته‌ای تحت تمرین یک ماهه با تواتر سه جلسه در هفته روی تردمیل قرار گرفتند (جدول ۱). (۱۳) اما گروه کنترل در پایان یک ماه فقط تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفت. در این پژوهش رت‌ها دو روز تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند تزریق اول با دوز ۱۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام شد و تزریق دوم ایزوپرنالین در روز بعد با دوز ۱۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بود. در نهایت پس از دو روز از تزریق دوم ایزوپرنالین رت‌ها با استنشاق کلروفرم بی‌هوش و سپس تشریح شدند و اندازه‌گیری بیان ژن bax و bcl2 به روش ریل تایم انجام شد. نتایج تحقیق با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و همچنین تحلیل واریانس یک طرفه و توکی تحلیل شد؛ اما برای بررسی میزان فیروز در گروه پایلوت روش آماری تی مستقل مورد استفاده قرار گرفت. ضمناً از نرم افزار spss نسخه ۱۸ به منظور محاسبه روش‌های آماری استفاده شد.

تکنیک رنگ آمیزی تری کروماتون مشخص کرد این مقدار تزریق دارو باعث سکنه در گروه پایلوت می‌گردد. زیرا آزمون تی مستقل نشان داد میزان فیروز بدست آمده از نرم افزار j image در بین گروه رت‌های تحت القای ایزوپرنالین و سالم تفاوت معنی‌داری وجود دارد. به طوری که فیروز (واحد پیکسل) گروه ایسکمی ریپرفیوژن (۱۰۷/۸۵) نسبت به گروه سالم (۲۴/۵۷) از میانگین بیشتری برخوردار بود ($\text{sig} = ۰/۰۰$)؛ لذا این یافته نشان می‌دهد که تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی توانایی ایجاد فیروز در قلب رت‌ها را دارد؛ که نشان دهنده سکنه قلبی است (شکل ۱).

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی پرایمرها

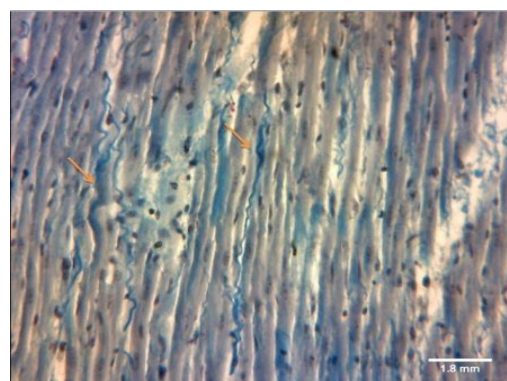
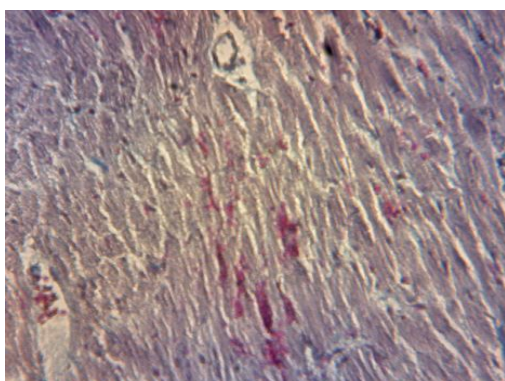
RNA نمونه‌های بطن چپ بوسیله ازلت مایع و هاون سنگی با روش استخراج دستی و پروتکل استاندارد ترایزول با کد ET101 متعلق به شرکت کانادایی Civic Bio science استخراج شد. به طوری که به ازای هر ۳۰ تا ۶۰ میلی گرم بافت، یک میلی لیتر محلول ترایزول به میکروتیوب حاوی بافت اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها پس از یک روز از فریز خارج شدند و به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (از شرکت مرک آلمان با کد ۱۰۲۴۴۵) به

مقدار ۹/۶۱۰ و ۰/۶۸۷ بود. با توجه به یافته جدول ۲، میزان بیان ژن BAX در بین گروه‌های تجربی تغییر معنی‌داری داشته است. در ادامه آزمون تعقیبی توکی در جدول ۳ نشان داد که بین گروه ملاتونین و گروه بی‌هوازی ملاتونین با آماره ۰/۰۰۱ و بین گروه کنترل و گروه ملاتونین بی‌هوازی با آماره ۰/۰۲۷ تأثیر معنی‌داری وجود دارد؛ اما بین گروه کنترل و گروه بی‌هوازی با آماره ۰/۹۴۷ تأثیر معنی‌داری گزارش نشد.

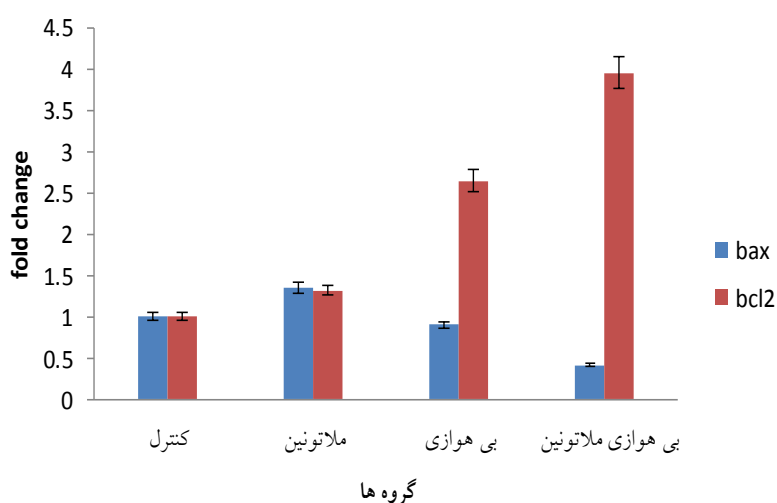
این تغییرات در گروه بی‌هوازی ملاتونین چشمگیرتر بوده است. در ادامه به منظور بررسی سطح معنی‌داری از مقادیر $2^{-\Delta\Delta CT}$ ژن-های bax و bcl2 استفاده شد؛ در ادامه آزمون آنووا و تعقیبی توکی برای ژن bax و bcl2 به منظور مقایسه گروه‌های تحقیق استفاده گردید (جدول ۲). برای رعایت پیش فرض آزمون تحلیل واریانس، آزمون لون برای هر دو متغیر استفاده شد که به ترتیب برای فاکتور BAX و BCL2 مقدار ۰/۱۸۷ و ۰/۰۵۸ گزارش شد. همچنین مقدار F برای هر دو متغیر BAX و BCL2 به ترتیب

جدول ۱: پروتکل تمرین بی‌هوازی

مؤلفه تمرین	مراحل تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین بی‌هوازی	سرد کردن
زمان تمرین (دقیقه)	زمان تمرین (دقیقه)	۶ دقیقه	۲۳-۱۵ دقیقه	۶ دقیقه
سرعت (m/min)	سرعت (m/min)	۲۰ تا ۱۵	۳۰ تا ۳۷	۱۵ تا ۲۰
مسافت	مسافت	۹۰ تا ۱۲۰ متر	۶۹۰ تا ۷۵۰ متر	۹۰ تا ۱۲۰ متر
شیب تدرمیل (درجه)	شیب تدرمیل (درجه)	صفر	۵ تا ۲۰ درجه	صفر



شکل ۱: تصاویر رنگ‌آمیزی تری کروماتسون بطن چپ رت‌های گروه سالم و گروه تحت القای ایزوپرنالین با بزرگ نمایی $\times 40$ که نشان دهنده میزان رسوب کلاژن بیشتر در گروه تحت القای ایزوپرنالین نسبت به گروه سالم می‌باشد که این موضوع وقوع سکته را در گروه ایزوپرنالین نشان می‌دهد.



شکل ۲: میزان Fold change بیان ژن BAX و BCL2 در گروه ملاتونین، بی‌هوازی و بی‌هوازی ملاتونین

جدول ۲: آزمون تحلیل واریانس برای مقایسه ژن‌های *bax* و *bcl2* در گروه‌های کنترل، ملاتونین، بی‌هوای، بی‌هوای ملاتونین

گروه‌های تحقیق	$-\Delta\Delta CT_{Bax}$	$-\Delta\Delta CT_{Bcl2}$	Fold change BAX	Fold change BCL2	انحراف استاندارد BAX	انحراف استاندارد BCL2	Sig BAX	Sig BCL2
کنترل	۱/۰۶۳۴	۲/۹۳	۱	۱	۰/۱۶	۱/۲۹	۰/۰۰۲	۰/۵۷۷
	۰/۸۵۱۹	۰/۵۲						
	۰/۸۸۸۱	۰/۲۵						
ملاتونین	۱/۱۹۶۴	۰/۳						
	۱/۴۰	۱/۶۸	۱/۳۵	۱/۳۲	۰/۲۵	۱/۱۱		
	۱/۰۵	۰/۴۱						
بی‌هوای	۱/۳	۲/۷۵	۰/۹۰	۲/۶۵	۰/۱۳	۲/۲۶		
	۱/۶۶	۰/۴۶						
	۰/۹۲	۰/۴۹						
بی‌هوای ملاتونین	۱/۰۱	۵/۷۸	۰/۴۱	۳/۹۶	۰/۳۷	۵/۸۹		
	۰/۷۱	۲/۶۲						
	۰/۹۸	۱/۷۲						
	۰/۹۰	۰/۲۴						
	۰/۵۱	۳/۰۱						
	۰/۰۶	۱۲/۵۷						
	۰/۲۰	۰/۰۳						

جدول ۳: آزمون تعقیبی توکی در گروه‌های تحقیق

متغیر وابسته	گروه	گروه‌ها	تفاوت میانگین	Sig
Bax	کنترل	بی‌هوای	۰/۰۹۵۵۸	۰/۹۴۷
		ملاتونین	-۰/۳۵۲۴۱	۰/۲۴۱
		بی‌هوای ملاتونین	۰/۵۸۳۸۰	۰/۰۲۷
	بی‌هوای	کنترل	-۰/۰۹۵۵۸	۰/۹۴۷
		ملاتونین	-۰/۴۴۷۹۹	۰/۱۰۳
		بی‌هوای ملاتونین	۰/۴۸۸۲۱	۰/۰۷۰
	ملاتونین	کنترل	۰/۳۵۲۴۱	۰/۲۴۱
		بی‌هوای	۰/۴۴۷۹۹	۰/۱۰۳
		بی‌هوای ملاتونین	۰/۹۳۶۲۱	۰/۰۰۱
	ملاتونین بی‌هوای	کنترل	-۰/۵۸۳۸۰	۰/۰۲۷
		بی‌هوای	-۰/۴۸۸۲۱	۰/۰۷۰
		ملاتونین	-۰/۹۳۶۲۱	۰/۰۰۱
Bcl2	کنترل	بی‌هوای	-۱/۶۵۰۵۸	۰/۸۹۰
		ملاتونین	۰/۳۲۶۱۳	۰/۹۹۹
		بی‌هوای ملاتونین	-۲/۹۶۳۸۴	۰/۵۹۱
	بی‌هوای	کنترل	۱/۶۵۰۵۸	۰/۸۹۰
		ملاتونین	۱/۳۲۴۴۵	۰/۹۳۸
		بی‌هوای ملاتونین	-۱/۳۱۳۲۵	۰/۹۴۰
	ملاتونین	کنترل	۰/۳۲۶۱۳	۰/۹۹۹
		بی‌هوای	-۱/۳۲۴۴۵	۰/۹۳۸
		بی‌هوای ملاتونین	-۲/۶۳۷۷۱	۰/۶۷۳
	ملاتونین بی‌هوای	کنترل	۲/۹۶۳۸۴	۰/۵۹۱
		بی‌هوای	۱/۳۱۳۲۵	۰/۹۴۰
		بی‌هوای	۲/۶۳۷۷۱	۰/۶۷۳

بحث

یافته تحقیق حاضر نشان داد که مصرف ملاتونین میزان بیان ژن آپوپتوزی bax و bcl2 را افزایش می‌دهد؛ که این یافته با یافته‌های تحقیق Forman و همکاران (۲۰۱۰) غیرهمسو است (۱۱). زیرا این محققان اثرات مفید ملاتونین را بر تغییرات قلب رت‌های پیر بررسی کردند؛ در حالی که تحقیق حاضر از رت‌های ۲ تا ۳ ماهه استفاده کرده است؛ و به نظر می‌رسد که در تحقیق Forman و همکاران ملاتونین بیشتر نقش آنتی اکسیدانی خود را اعمال کرده است زیرا آنتی اکسیدان‌ها در رت‌های پیر کاهش می‌یابد و متعاقباً با تیمار ملاتونین تا حدودی این کاهش جبران می‌شود و می‌تواند از حجم آپوپتوز و نشانگرهای آن مانند bax و bad بکاهد. در حالی که در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد ملاتونین بیشتر نقش خواب‌آوری و رگ‌گشایی خود را در رت‌های ۲ تا ۳ ماهه اعمال کرده است؛ به طوری که با خواب‌آوری و عدم تحرک و عمل رگ‌گشایی میزان نفوذ چربی در میوکارد افزایش یافته و در ادامه شاخص‌های التهابی مانند $TNF-\alpha$ و رادیکال‌های آزاد مانند ROS و RNS بیشتر می‌شوند و در نهایت میوکارد مستعد به آسیب ایسکمی می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد ملاتونین با ویژگی‌های خود مانند خاصیت آنتی اکسیدانی، رگ‌گشایی و خواب‌آوری می‌تواند نقش دوگانه ایفا کند؛ به طوری که اگر خاصیت آنتی اکسیدانی آن غالب شود می‌تواند نقش مفیدی اعمال کند؛ اما در صورتی که نقش رگ‌گشایی و خواب‌آوری آن غالب گردد می‌تواند نقش زیان‌آوری ایفا کند.

همچنین به نظر می‌رسد دلیل افزایش bcl2 این باشد که ترکیبات حساس به ردوکس در سیگنالینگ محافظت سلول ملاتونین درگیر می‌شوند و منجر به پاسخ رونویسی AP-1 و Nrf2 می‌گردند. با این مسیرها، ملاتونین باعث تحریک ژن‌های آنتی اکسیدانی و دفع مسمومیت می‌شود و به نوبه خود به عنوان افزایش دهنده سیستم گلوکوتایون عمل می‌کند. در نهایت ملاتونین سبب کاهش تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و فعالیت عوامل آنتی آپوپتوزی bcl2 و حساس به ردوکس می‌گردد (۱۴). از طرف دیگر Salari lak و همکاران (۱۳۹۰) بیان کردند که تولید زیاد رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها، سبب اختلال در ساختمان غشای لیپیدی و دیگر ترکیبات سلولی می‌گردد. این محققین از یافته‌های خود نتیجه گرفتند که مصرف ملاتونین از تغییرات پروفایل‌های چربی و افزایش MDA ناشی از رژیم غذایی با فروکتوز بالا در بافت قلبی جلوگیری می‌کند (۱۵). زیرا این هورمون پس از عبور از غشای زیستی بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی را تحریک و ژن‌های پرواکسیدان را مهار می‌کند، و به این ترتیب توان آنتی اکسیدانی سلول‌ها را بیشتر می‌نماید (۱۶). همچنین دیگر دلیل احتمالی افزایش ژن BCL2 کاهش آدرنالین و متعاقباً حفظ هموستاز کلسیم است که منجر به رگ‌گشایی عروق میوکارد می‌-

شود؛ در نتیجه منجر به حداقل اختلال و نفوذپذیری میتوکندری سلول می‌گردد؛ بنابراین خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین سبب کاهش iNOS و اکسیدان‌ها و همچنین افزایش NRF2 و مسیر JAK2/STAT3 می‌گردد که هر دو باعث مهار التهاب و اکسیداسیون میوکارد می‌شوند؛ (۱۴) اما از طرف دیگر عدم تحرک گروه ملاتونین، ممکن است سبب افزایش آدیپوکاین‌ها مانند ویسفاتین در درون پلاسما گردند؛ که در نهایت التهاب و اکسیداتیو میوکارد را افزایش می‌دهند؛ و میوکارد را بیشتر مستعد به آسیب ایسکمی می‌گردانند. در عین حال وقتی که نفوذ لیپیدها و عوامل اکسیدانی بر اکسیداسیون لیپیدها و عوامل آنتی اکسیدانی غالب شوند می‌توانند نقش زیان‌آوری در میوکارد ایجاد کنند. لذا به نظر می‌رسد که ملاتونین می‌تواند دارای اثرات چند وجهی برای آسیب ایسکمی ریپرفیوژن قلب باشد.

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوای میزان بیان ژن bax و bcl2 را کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن معنی‌دار نبود. این یافته‌ها از نظر اینکه میزان بیان ژن bax و bcl2 را کاهش و افزایش داده است با تحقیقات Santos و همکاران، Santana و همکاران و Chengji و همکاران همسو است (۳، ۱۷ و ۱۸)، اما از نظر معنی‌داری غیر همسو است. یک تفاوت اساسی در تحقیق حاضر و پژوهش Santos و همکاران این است که تحقیق حاضر رت‌های سالم را مورد بررسی قرار داده است در حالی که سانتوز و همکاران رت‌های دیابتی را بررسی کرده‌اند. حال به نظر می‌رسد رت‌های دیابتی تا حدودی نشانگرهای آپوپتوزی در آنها بارزتر است و به همین دلیل تمرین ورزشی توانسته است بر میزان بیان ژن آپوپتوزی تأثیر بیشتری بگذارد؛ در حالی که تحقیق حاضر رت‌های سالم را تحت تمرین بی‌هوای قرار داده است. در تأیید این مطلب پژوهش Santos و همکاران نشان دادند میزان پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی BCL-XL در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کمتر بوده است. با این حال، رت‌های پژوهش سانتوز و همکاران ۱۰ هفته و هر هفته ۵ بار تمرین کرده‌اند؛ در حالی که رت‌های تحقیق حاضر ۴ هفته و در هر هفته ۳ بار تمرین داده شده‌اند. به نظر می‌رسد مدت تمرین به منظور سازگاری ویژگی‌های تمرین می‌تواند مفید باشد. همچنین، به نظر می‌رسد اگر مدت زمان جلسات تمرین بیشتر شود یا تواتر آن در هفته افزایش یابد ممکن است بر میزان بیان نشانگرهای آپوپتوزی bax تأثیر گذار باشد. زیرا با سازگاری تمرین عوامل اکسیدانی، پروفایل‌های چربی، التهاب و در نهایت عوامل آپوپتوزی مانند کاسپاز ۳ کاهش می‌یابند و در مقابل عوامل آنتی اکسیدانی، پیش بقای سلولی مانند مسیر IGF1-R/PI3K/AKT افزایش می‌یابند که در مجموع می‌توانند آپوپتوز قلبی را کاهش دهند. نتایج بالا همچنین با تحقیقات jafari

دهند؛ (۱۸) حال با توجه به موارد ذکر شده به نظر می‌رسد که با افزایش مدت زمان تمرین و مصرف ملاتونین می‌توان به نتیجه بهتری امید داشت.

البته دلیل افزایش بیشتر بیان ژن BCL2 در گروه تمرین ورزشی با ملاتونین در مقابل تمرین ورزشی به تنهایی به نظر می‌رسد میزان التهاب کمتر در گروه ورزشی با مصرف ملاتونین باشد. زیرا Veneroso و همکاران بیان کردند هنگامی که عضله قلب تحت ورزش حاد قرار می‌گیرد باعث افزایش علائم آسیب سلولی می‌شود؛ چرا که ورزش همراه با افزایش معنی‌دار فعالیت مالوپراکسیدازها و سطوح mRNA، TNF- α ، IL-1 و IL-6 است. علاوه بر این، محققین نشان دادند غلظت mRNA و پروتئین مولکول چسبان درون سلولی ۱، نیتریک اکساید سنتتاز القایی و سیکلوآکسیژناز ۲ افزایش یافت. همچنین فعالیت معنی‌دار NF-KB در رت‌های تمرین کرده مشاهده شد. در مقابل این اثرات به طور کلی و جزئی با تیمار ملاتونین مسدود شد. بنابراین می‌توان گفت ملاتونین از آسیب قلبی ناشی از ورزش محافظت می‌کند. در تأیید این مطلب kumar و همکاران نشان دادند در افراد پس از ورزش، محصولات پراکسیداسیون لیپید مانند مالونیل دی آلدئید به طور معنی‌داری افزایش داشت؛ در حالی که سوپر اکسید دسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز کاهش داشت. همچنین سطح پایه محصولات پراکسیداسیون لیپید در افراد تحت درمان با ملاتونین در مقایسه با مطالعه بدون ملاتونین به طور معنی‌داری کاهش داشت؛ در ادامه کاهش سوپراکسید دسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز ناشی از ورزش پس از درمان با ملاتونین جلوگیری شد (۲۲). در تأیید مطالب فوق santos و همکاران نشان دادند رت‌های تمرین کرده تحت استانزلول، افزایشی در فشار خون و وزن نسبی قلب را تجربه کردند؛ و آنها انحراف محور چپ قلب را افزایش دادند. البته اگرچه ملاتونین هایپرتروفی قلبی را در رت‌های تحت درمان با استانزلول جلوگیری نکرد؛ اما فشار خون و فعالیت کاتالاز قلبی را حفظ کرد؛ و از انحراف محور الکتریکی قلب ناشی از استانزلول جلوگیری کرد. این یافته نشان داد که تجویز مزمن استانزلول باعث اثرات جانبی قلبی عروقی می‌شود که تا حدی با تیمار ملاتونین کاهش می‌یابد. در پایان محققین ذکر کردند که ترکیب ملاتونین و ورزش می‌تواند اثرات جانبی استانزلول را در سیستم قلبی عروقی به حداقل برساند (۱۷).

نتیجه‌گیری

حال با توجه به یافته تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین به نظر می‌رسد ملاتونین همراه با ورزش می‌تواند از اختلالات سیستم قلبی عروقی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، ROS، RNS، اکسیدان‌ها و عوامل آپوپتوزی مانند BAX جلوگیری کند و از طرف دیگر عوامل آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دسموتازها و گلوکاتایون و همچنین

و همکاران scott و همکاران همسو است (۱۹، ۲۰)، اما از نظر سطح معنی‌داری غیر همسو است. اسکات و همکاران بیان کردند که تمرین ورزشی، اثر محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن میوکارد دارد. زیرا تمرین هوای مکانیزم‌های مورد نظر اثرات محافظت قلبی ناشی از ورزش را مانند افزایش گردش خون شریان کرونری، بیان پروتئین‌های استرس شبکه آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلوآکسیژناز ۲، القای پروتئین‌های شوک گرمایی میوکارد، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی سیتوزولی میوکارد، افزایش سیگنالینگ نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی، تغییر و افزایش کانال‌های پتاسیم حساس به ATP سارکولمایی و غشای داخلی میتوکندریایی بهبود می‌دهد. در نهایت محققین نشان دادند که افزایش سطوح آنتی اکسیدانی میوکارد و افزایش بیان کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP به محافظت قلبی ناشی از ورزش در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن کمک می‌کند؛ چرا که عوامل ذکر شده سبب کاهش آسیب به میتوکندری می‌شود و استحکام غشای میتوکندری را افزایش می‌دهند که در نهایت سبب افزایش بیان ژن bcl2 در میتوکندری می‌گردد (۲۰). در عین حال به نظر می‌رسد با افزایش مدت زمان تمرین و همچنین تواتر تمرین در هفته بتوان این افزایش بیان ژن bcl2 را ارتقا بخشید؛ چرا که عوامل ذکر شده در بالا با سازگاری تمرین فرصت افزایش بیشتری می‌یابند و در نتیجه میوکارد آمادگی بیشتری برای مقابله به آسیب ایسکمی ریپرفیوژن خواهد داشت.

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوای با مصرف ملاتونین میزان بیان ژن bax و bcl2 میوکارد را کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش در bax در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بیان نشد؛ اما در مقایسه با گروه ملاتونین معنی‌دار بیان شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که تمرین هوای با مصرف ملاتونین توانسته است میزان بیان bax را نسبت به سایر گروه‌ها به مقدار بیشتر کاهش دهد؛ زیرا به نظر می‌رسد مصرف ملاتونین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود توانسته به عدم سازگاری تمرین در گروه تمرین بی‌هوای کمک کند و کمبودهای آنتی اکسیدانی را جبران نماید؛ و از طرف دیگر تمرین ورزشی به طور احتمالی میزان نفوذ پروفایل‌های چربی مانند LDL و VLDL را در گروه ملاتونین به دلیل عدم تحرک و خواب‌آوری جبران کرده است و این عوامل اثر افزایشی بر هم گذاشته‌اند که در نهایت منجر به کاهش میزان bax در میوکارد شده‌اند. از طرف دیگر ورزش و ملاتونین به طور احتمالی هموستاز کلسیم، نفوذپذیری میتوکندری، رهایش سیتوکروم C و آدرنالین را بهبود می‌بخشند که همه این عوامل می‌توانند در کاهش آسیب ایسکمی ریپرفیوژن دخالت کنند. در نهایت پژوهشی نشان داد ورزش و ملاتونین با توجه به افزایش عوامل پیش بقا مانند مسیرهای سلولی IGF1-R/PI3K/AKT و JAK2/STAT3 می‌توانند میزان پیش بقای میوکارد را افزایش

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابل از انتشار و تالیف این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

ضمناً ح. ع و ح. ر در طراحی، اجرا و تحلیل مطالعه همکاری داشته‌اند؛ اما سایر همکاران در مشاوره، پیش نویس و ویرایش مطالعه سهم بوده‌اند و همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تأیید کرده‌اند.

منابع مالی

این مقاله منابع مالی نداشته است.

عوامل آنتی آپوپتوزی مانند BCL2 و پروتئین‌های شوک گرمایی مانند HSP70 و HSP72 و پروتئین‌های کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم را افزایش دهد. از این رو توصیه می‌گردد با افزایش مدت زمان، شدت و تواتر تمرین در هفته همراه با مصرف ملاتونین بتوان از میزان حجم آپوپتوز ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کاست.

قدردانی

این مقاله، حاصل یک کار پژوهشی در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه خوارزمی است؛ و از خانم تایانلو و کریم‌زاده برای زحمات بی‌دریغشان تقدیر و تشکر می‌نمایم.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه بهداشت و درمان بهبهان استان خوزستان به شماره مرجع ۹۴/۷۲/۲۵ به تأیید رسیده است و دارای کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1394.462 می‌باشد.

References

1. Longo F, Kasper H, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. New York, McGraw-Hill Professional, 2012.
2. Sheryatzadeh M, Apoptosis programmed cell death. 1st ed. Arak, arak Univ Press, 2009.
3. Santana E, Serra A, Junior J, Bocalini D, Barauna V, Krieger J, Tucci P. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz, Rio Claro* 2014; **20**(2): 233-238. doi: 10.1590/S1980-65742014000200015.
4. Bum Kwak H, Song W, Lawler J M. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB Journal* 2006; **20**(6): 791-793. doi: 10.1096/fj.05-5116fje.
5. Delchev S, Georgieva K, Koeva Y, Atanassova P. Bcl-2 and Bax expression in rat myocardium after acute exercise and endurance training. *Bulgaria* 2005; **19**(21): 269-276.
6. Lajoie C, Calderone A, Béliveau L. Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 2004; **449**(1): 26-32. doi: 10.1007/s00424-004-1307-0.
7. Ehrman J, Gordon P, Visich P, Keteyian S. *Clinical Exercise Physiology*. 3rd ed. New York, Human Kinetics, 2013.
8. Farhud D, Yazdanpanah L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Deficiency. *Iranian J Publ Health* 2008; **37**(4): 1-18.
9. Petrosillo G, Venosa N, Pistolese M, Casanova G, Tiravanti E, Colantuono G, et al. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemiareperfusion: role of cardiolipin. *The FASEB Journal* 2006; **20**(2): 269-276. doi: 10.1016/j.bbabo.2007.07.011.
10. Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. *Eur J Pharmacol* 2010; **644**(1-3): 160-168. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.06.065.
11. Forman K, Vara E, Garcia C, Kireev R, Cuesta S, Acuna-Castroviejo D, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res* 2010; **49**(3): 312-320. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00800.x.
12. Azamianjazi A, Hafezi M, Cheraghi J, Abdi H. The Combined Effect of Endurance Training and Atorvastatin on the Extent of Necrosis Damage and Fibrosis Tissue in Male Wistar Rats Heart after Experimental Myocardial Infarction. *SJIMU* 2016; **23**(7): 28-38.
13. Høydal M A, Wisløff U, Kemi O J, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovascular Prev Rehabil* 2007; **14**(6): 753-760. doi: 10.1097/HJR.0b013e3281eacef1.
14. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 2010; **24**(10): 3603-3624. doi: 10.1096/fj.10-154450.
15. Salari lak L, Heidari R, Nejati V. Protective Effects of Melatonin on Lipid Profile in Fructose Induced Dyslipidemia. *IJEM* 2011; **13**(4): 406-411.

16. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin; multiplicity of mechanism from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; **27**(2): 119-130. doi: doi.org/10.1385/endo:27:2:119
17. Santos G, Rodrigues M, Goncalves E, Marcondes M. Areas M. *Melatonin Reduces Oxidative Stress and Cardiovascular Changes Induced by Stanozolol in Rats Exposed to Swimming Exercise*. *Eurasian J Med* 2013; **45**(3): 155-162. doi: 10.5152/eajm.2013.33.
18. Chengji W, Shoujun H. Aerobic exercise can ameliorate heart function in patients with myocardial infarction through up-regulating m3 receptor. *IJC Metabolic & Endocrine* 2016; **13**: 1-5. doi: 10.1016/j.ijcme.2016.08.001.
19. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of Exercise Training on Bcl-2 and Bax Gene Expression in the Rat Heart. *Gene Cell Tissue* 2015; **2**(4): e32833. doi: 10.17795/gct-32833.
20. Scott K, John C, Quindry Andreas N, Kavazis. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**(2): 193-201. doi: 10.1152/physiol.00030.2013. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006
21. Veneroso C, Tuno M, Javier Gallego J, Collado P. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res* 2009; **47**(2): 184-191. doi: 10.1111/j.1600-079x.2009.00699.x
22. Kumar K, Naidu M. Effect of oral melatonin on exercise-induced oxidant stress in healthy subjects. *Indian Journal of Pharmacology* 2002; **34**: 256-259.

Comparison of two different dosages of the tranexamic acid on reducing of bleeding during spinal fusion surgery

Ali mohamadian Erdi¹, Mahzad Yousefian^{2*}, Mir Hossein Mossavi, Atefeh Shadman

Department of Anesthesiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

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

Received: 7 August 2018 Accepted: 20 August 2017 First Published online: 4 July 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):78-84

Abstract

Background: One of the problems that influenced surgeon and anesthesiologist in strummental spinal fusion surgery (CD surgery) is the excessive bleeding during surgery. There are different ways for reducing bleeding during surgery such as the intravenous administration of tranexamic. In this study the effect of two doses of tranexamic acid for reducing of bleeding in spinal fusion surgery was evaluated.

Methods: This clinical trial study was performed on 75 patients with class I and II ASA patients scheduled for strummental spinal fusion surgery under the same general anesthesia. The patient's randomly divided into 3 groups. One group received single dose of tranexamic acid and another group received single dose of tranexamic acid plus maintenance dose of tranexamic acid that continued during surgery and the control group received normal saline as a placebo. The blood loss during surgery and until 24 hours later was documented. Bleeding score and surgeon satisfaction scores were recorded.

Results: The amount of blood loss was reduced in both groups receiving the tranexamic acid (934 cc in control group, 664cc in single dose group and 758 cc in single dose plus maintenance dose group). But the difference was not statistically significant. (P value>0.05).

Conclusion: The quality of surgery field, surgeon satisfaction scores and blood transfusion to patients in 3 groups was not significantly different.

Keyword: Tranexamic Acid, Bleeding, Spinal Fusion Surgery.

How to cite this article: mohamadianErdi A, Yousefian M, Mossavi M H, Shadman A. [Comparison of two different dosages of the tranexamic acid on reducing of bleeding during spinal fusion surgery]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):78-84. Persian.

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر دو روش مختلف تزریق ترانگزامیک اسید در کاهش خونریزی ناشی از جراحی تثبیت ستون مهره‌ها (CD گذاری)

علی محمدیان اردی^۱، مهزاد یوسفیان^{۱*}، میر حسین موسوی^۱، عاطفه شادمان^۲^۱گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
^۲متخصص گروه پزشکی اجتماعی، گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
* نویسنده مسئول: ایمیل: dr_mahzad@yahoo.comدریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۹ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۷۸-۸۴

چکیده

زمینه: یکی از دغدغه‌های جراح و متخصص بیهوشی در عمل جراحی تثبیت ستون مهره‌ها معروف به عمل CD گذاری، میزان زیاد خونریزی در حین جراحی است که علاوه بر مزاحمت برای جراح، عوارض خونریزی و تزریق خون برای بیمار را نیز به همراه دارد. راههای مختلفی برای کاستن از میزان خونریزی حین جراحی استفاده شده است که یکی از آنها استفاده از داروهای آنتی فیبرینولیتیک از جمله ترانگزامیک اسید می‌باشد. در این مطالعه، تاثیر دو روش مختلف تزریق ترانگزامیک اسید بر کاهش مقدار خونریزی بیماران تحت عمل جراحی تثبیت ستون مهره‌ها، مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این کارآزمایی بالینی دو سوکور تعداد ۷۵ بیمار داوطلب جراحی تثبیت ستون فقرات با ASA کلاس I یا II وارد مطالعه شدند. بیماران به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم و با روش یکسان تحت بیهوشی قرار گرفتند. به یک دسته از بیماران داروی ترانگزامیک اسید فقط بصورت تک دوز تزریق و به گروه دوم علاوه بر آن، انفوزیون نگهدارنده دارو در طول جراحی ادامه یافت. به گروه شاهد نرمال سالین به عنوان دارونما تزریق شد. میزان خونریزی در طول عمل و تا ۲۴ ساعت بعد، میزان رضایت جراح و میزان خون تزریق شده به بیمار در اتاق عمل و پس از جراحی در بخش بستری، ارزیابی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان خونریزی اگر چه با تزریق داروی ترانگزامیک اسید کاهش یافته بود، (۹۳۴ سی سی در گروه بدون دارو و ۶۶۴ سی سی در گروه تک دوز و ۷۴۶ سی سی در گروه تک دوز و انفوزیون نگهدارنده) اما از نظر آماری معنی دار نبود ($P < 0/05$). میزان کیفیت موضع جراحی، رضایت جراح از محل عمل و میزان خون تزریق شده به بیماران در ۳ گروه تفاوت آماری معناداری نشان ندادند.

نتیجه گیری: کاهش میزان خونریزی بدنال تزریق داروی ترانگزامیک اسید در جراحی تثبیت ستون مهره‌ها در این مطالعه، گرچه از نظر بالینی قابل توجه بود ولی از نظر آماری معنادار نبود. یکی از دلایل آن می‌تواند کمبود تعداد نمونه‌ها باشد. توصیه می‌شود تحقیق مشابه با تعداد بیشتری از نمونه‌ها انجام شود.

کلید واژه‌ها: ترانگزامیک اسید، جراحی تثبیت ستون مهره‌ها، خونریزی

نحوه استناد به این مقاله: محمدیان اردی ع، یوسفیان م، موسوی م ح، شادمان ع. مقایسه اثر دو روش مختلف تزریق ترانگزامیک اسید در کاهش خونریزی ناشی از جراحی تثبیت ستون مهره‌ها (CD گذاری). مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۷۸-۸۴

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

استفاده از ابزارهای فلزی جهت تثبیت مهره‌های ناپایدار ناشی از تروما به ستون فقرات یکی از روشهای شایع درمان شکستگی مهره‌ها و جلوگیری از صدمات وارده به نخاع می‌باشد. استفاده از پیچهای پایه‌دار در جراحی ستون مهره‌ها به CD گذاری معروف است.

جراحی روی ستون فقرات معمولاً با خونریزی زیاد حین عمل همراه است و شدت خونریزی با تکنیک جراحی، مدت زمان عمل، تعداد ستون مهره‌ای که بهم وصل می‌شوند، داروی بیهوشی، فشار متوسط شریانی، اختلال پلاکسی، اختلال انعقادی ترقیقی و فیبرینولیز اولیه مرتبط است. اقدامات مفیدی جهت کاهش خونریزی بکار می‌روند مانند دادن وضعیت صحیح به بیمار جهت کاهش فشار شکمی، هموستاز جراحی و کنترل هیپوتانسیون (۱).

استفاده از عوامل دارویی که تشکیل لخته را تسریع می‌کنند نیز یکی از روشهای کاهش میزان خونریزی است. آنالوگهای صنعتی لیزین مثل آمینو کاپروئیک اسید و آپروتینین با مکانیسم کاهش فیبرینولیز باعث کاهش خونریزی حین عمل می‌شوند، اما در بیماران با مشکلات قلبی انجام این کار نگران کننده است (۱).

داروی ترانگزامیک اسید به عنوان یک داروی آنتی فیبرینولیتیک با قیمت مناسب، جهت کنترل خونریزی در دسترس می‌باشد. این دارو مشتق سنتتیک اسید آمینه لیزین بوده و با اثرگذاری روی پلاسمینوژن و ممانعت از تبدیل آن به پلاسمین از فیبرینولیز جلوگیری نموده و باعث پایداری لخته خون می‌شود (۲). از این دسته دارویی در درمان هموفیلی، بیماری فون ویلبراند، منوراژی اولیه و کنترل خونریزی گوارشی و ارولوژی، جراحیهای کاردیوتوراسیک و بیماران مبتلا به ترومبوسیتوپنی، همچنین جراحیهای بزرگ ارتوپدی و ستون فقرات استفاده شده است (۳، ۴). عوارضی مانند تهوع، استفراغ، سردرد، تاری دید و سرگیجه با مصرف دارو گزارش شده است ولی بطور کلی این دارو، یک داروی ایمن است. گرچه موارد نادری از تشکیل ترومبوز گزارش شده است ولی در هر حال شواهدی برای افزایش خطر تشکیل ترومبوز در جراحیهای بزرگ وجود ندارد (۵).

ترانگزامیک اسید را می‌توان با تزریق بولوس ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار شروع و پس از آن با تزریق مداوم یک میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار در ساعت ادامه داد. یک مطالعه متاآنالیز در باره استفاده از ضد فیبرینولیتیکها در بیماران ارتوپدی نشان داد که هر چند هم آپروتینین و هم ترانگزامیک اسید در کاهش از دست رفتن خون موثر هستند، داده‌ها برای نشان دادن تاثیر آمینوکاپروئیک اسید کافی نبود (۶).

این تحقیق جهت بررسی میزان تاثیر داروی تزریقی ترانگزامیک اسید با دو روش تجویز مختلف، بر روی میزان خونریزی ناشی از عمل جراحی تثبیت ستون فقرات با استفاده از ابزار (معروف به CD گذاری) در بیمارستان فاطمی اردبیل انجام شد.

روش کار

جامعه‌ی آماری این مطالعه کارآزمایی بالینی parallel بیمارانی هستند که تحت عمل جراحی تثبیت مهره‌های توراکولومبار در بیمارستان فاطمی اردبیل قرار گرفته‌اند. این تریال در وب سایت IRCT.ir با کد IRCT2015101924601N1 ثبت شد.

معیارهای ورود و خروج: بیماران ۱۸ تا ۶۰ ساله که در ارزیابی قبل از عمل، کلاس ۱ و ASA ۲ (کلاس ۱ و ۲ انجمن بیهوشی آمریکا) داشتند پس از اخذ رضایت وارد مطالعه شدند. بیماران دارای مشکلات انعقادی، مصرف داروهای ضدانعقاد، سابقه بیماری عروقی قلبی و مغزی، بیماری فشار خون، بیماری عروق محیطی، سابقه ترومبوز وریدهای عمقی، سابقه آمبولی ریوی، بیماران دارای کلاس ASA بیش از II و زنان باردار و شیرده از مطالعه خارج شدند. ترانگزامیک اسید بعنوان داروی مداخله در این مطالعه بکار رفت. بعد از القای بیهوشی به روش یکسان در گروهها (روش بیهوشی در ادامه توضیح داده خواهد شد) بیماران در سه گروه تقسیم شدند.

گروه اول (گروه A) به عنوان گروه شاهد ۱۰۰ سی سی نرمال سالین بصورت انفوزیون دریافت کردند.

گروه دوم (گروه B) پس از بیهوش شدن ترانگزامیک اسید به میزان ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار دریافت کردند. در گروه سوم (گروه C) علاوه بر دریافت این میزان از داروی ترانگزامیک اسید انفوزیون دارو به میزان ۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار در ساعت در طول عمل ادامه یافت.

پس از اتمام جراحی مدت زمان جراحی و حجم کل خون موجود در ساکشن از طریق کسر نمودن مقدار سرم استفاده شده از مقدار خون و سرم جمع‌آوری شده در ساکشن بعلاوه خون موجود در گازهای جراحی (توزین گازها) و خون خارج شده از درن محل عمل تا ۲۴ ساعت پس از عمل جراحی محاسبه و ثبت گردید.

آزمایشات INR، PTT، PT، CBCdiff (قبل از جراحی، زمان شروع و خاتمه عمل)، فشار خون (SBP, DBP, MAP) و تعداد ضربان قلب قبل از القاء بیهوشی و در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و (قبل از بیهوشی و حین عمل) ۱۸۰ و همچنین نمره کیفیت موضع عمل جراحی از نظر خونریزی براساس مقیاس بوزارت (Boezart) (جدول ۱) (طول عمل و ۲۴ ساعت پس از عمل) و میزان رضایت جراح از کنترل خونریزی با مقیاس پنج تایی لیکرت (Likert) (جدول ۲) شامل معیارهای خیلی بد، بد، متوسط، خوب و عالی (در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰) ثبت شد.

با توجه به طول مدت مطالعه، نمونه‌های در دسترس و مطالعات مشابه انجام یافته، حجم نمونه ۷۵ نفر در نظر گرفته شد که در سه گروه ۲۵ نفره قرار گرفتند. تخصیص تصادفی با روش Block Balance Random (سایز بلوکها = ۶) انجام شد و

صورت خونریزی زیاد از محل عمل و با توجه به هموگلوبین اولیه و با هماهنگی جراح در صورت نیاز تزریق خون بصورت پک سل انجام شد. در این مطالعه مقرر شد در مواردی که خونریزی بیمار کنترل نمی‌شود تزریق TNG با دوز $5\text{mcg}/\text{Min}$ و با هدف کاهش فشار خون تا حداقل $\text{MAP}=60\text{mmHg}$ انجام گیرد و از آن به عنوان اقدام اضافی جهت کنترل خونریزی یاد شود.

یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۷۵ بیمار که جهت انجام عمل جراحی فیکساسیون ستون مهره‌های توراکولومبار به بیمارستان فاطمی اردبیل مراجعه کردند انجام شد که شامل ۳ گروه ۲۵ نفره بودند. محدوده سنی بیماران مورد مطالعه بین ۱۸ تا ۶۰ سال بود. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه معادل $44/43 \pm 13/67$ سال بدست آمد. جدول ۳ مقایسه متغیرها را در بین گروه‌ها در پایه نشان می‌دهد. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه به سال، $48/9$ در گروه A و $43/7$ در گروه B و $40/6$ در گروه C بود و اختلاف آماری معنی‌داری بین سه گروه از نظر توزیع سنی مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان وزن، هماتوکریت، تعداد پلاکت، PTT، PT، تعداد ضربان قلب، فشارخون سیستولیک، دیاستولیک و فشار متوسط شریانی در زمان قبل از القای بیهوشی ثبت و مقایسه گردید. تفاوت آماری معنی‌داری بین سه گروه از نظر معیارهای ذکر شده مشاهده نشد. همچنین سه گروه مورد مطالعه از نظر جنسیت و سابقه بیماری طبی زمینه‌ای و سابقه مصرف دارو مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند که مشابه بودند. طول مدت عمل جراحی در ۳ گروه مورد مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به $P=0/13$ ، اختلاف آماری معناداری بین ۳ گروه مشاهده نشد. میانگین خونریزی در اثر عمل جراحی با توجه به خون موجود در ساکشن (پس از کسر نمودن سرم شستشو) و گازهای جراحی آغشته به خون (توزین با ترازو) و خون خارج شده از درن جراحی تا ۲۴ ساعت پس از عمل مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به ارقام بدست آمده خونریزی در گروه A (بدون دارو) بیشتر از گروه‌های دیگر بوده است ولی از نظر آماری معنادار نمی‌باشد ($P>0/05$). تعداد واحد گلبول قرمز فشرده (پک سل) که به علت شدت خونریزی، در اتاق عمل و در بخش به بیمار تزریق شده است مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده میزان خون تزریقی در گروه‌های مختلف تفاوت آماری معناداری نداشته است. میزان کیفیت موضع جراحی بر اساس معیار بوزارت و میزان رضایتمندی جراح بر اساس معیار لیکرت در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و تعیین گردید. براساس نتایج بدست آمده در تمام این دقایق کیفیت موضع جراحی و میزان رضایتمندی جراح بر اساس معیارهای مربوطه تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. تعداد ضربان قلب در زمان قبل از القای بیهوشی و دقایق

تخصیص گروه‌ها با نسبت ۱:۱:۱ بود و بیماران در سه گروه قرار گرفتند: گروه درمان ترانگزامیک اسید با دوز بالا، گروه درمان ترانگزامیک اسید با دوز پایین و گروه پلاسبو. در این مطالعه دوسوکور جهت کورسازی مطالعه سه بسته دارویی تهیه شد. داخل بسته‌ی A یک سرنگ ۱۰ سی‌سی حاوی ۱۰ سی‌سی نرمال سالین و یک سرنگ ۵ سی‌سی حاوی ۵ سی‌سی نرمال سالین به عنوان بسته‌ی دارونما وجود داشت. بسته B حاوی یک سرنگ ۱۰ سی‌سی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم ترانگزامیک اسید به حجم ۱۰ سی‌سی و یک سرنگ ۵ سی‌سی حاوی ۵ سی‌سی نرمال سالین بود. و بسته C حاوی یک سرنگ ۱۰ سی‌سی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم ترانگزامیک اسید و یک سرنگ ۵ سی‌سی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم ترانگزامیک اسید بود. در خصوص هر سه بسته‌ی دارویی محتویات سرنگ ۱۰ سی‌سی با دوز ۰/۱ سی‌سی به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار با میکروست و با اضافه نمودن نرمال سالین تا حجم ۱۰۰ سی‌سی در عرض ۱۰ دقیقه انفوزیون شد و محتویات سرنگ ۵ سی‌سی با اضافه نمودن نرمال سالین به حجم ۵۰ سی‌سی رسانده و با پمپ انفوزیون با سرعت ۰/۱ سی‌سی به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار انفوزیون شد. اطلاعات بیماران با استفاده پرسشنامه محقق ساخته مشتمل بر مشخصات بیمار (سن، جنس، وزن، سابقه بیماری و یا مصرف دارو)، نتایج آزمایش خون قبل از عمل و تعداد ضربان قلب، میانگین فشار شریانی، فشارخون سیستولیک و دیاستولیک، درجه رضایت‌مندی جراح از محیط عمل جراحی و نمره کیفی بوزارت در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰، مقدار خونریزی حین عمل جراحی، مدت زمان جراحی و عوارض احتمالی مصرف ترانگزامیک اسید تهیه گردید. اطلاعات کد بندی شده وارد نرم‌افزار SPSS-18 شده و با آزمونهای آماری کای دو، و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. انجام بیهوشی در هر ۳ گروه به طور یکسان انجام گرفت. پس از انجام مانیتورینگ معمول شامل فشارخون غیرتهاجمی، پالس اکسی متری، ECG و ETCO2، پیش داروی فنتانیل با دوز ۲ میکروگرم و میدازولام ۰/۰۲ میلی‌گرم به اِزاء هر کیلوگرم وزن بدن تجویز گردید. سپس القاء بیهوشی با پروپوفول ۲/۵ و آتراکوریوم ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم انجام شد. بعد از لوله‌گذاری تراشه حفظ بیهوشی با انفوزیون پروپوفول به میزان ۱۰۰ میکروگرم به اِزاء هر کیلوگرم در دقیقه و رمی فنتانیل با دوز $0/1\text{mcg}/\text{kg}/\text{min}$ برقرار و تهویه کنترل به هدف حفظ نورموکاپنی و با مخلوط ۵۰٪ نیتروز اکساید و اکسیژن انجام گردید. پس از پایان یافتن جراحی بازگرداندن شلی عضلانی با نئوستگمین ۰/۰۴ و آتروپین ۰/۰۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم صورت گرفت. به تمام بیماران قبل از القاء بیهوشی ۳ میلی‌لیتر به اِزاء هر کیلوگرم سرم ایزوتونیک تزریق و در حین جراحی نیز مایع نگهدارنده بر حسب وزن بیمار تجویز و خونریزی با سرم رینگر به نسبت ۳ به ۱ جبران گشت. در

۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ اندازه‌گیری شد. میانگین تعداد ضربان قلب در سه گروه محاسبه گردید و با هم مقایسه شدند. میانگین تعداد ضربان قلب در سه گروه براساس آزمون ANOVA تفاوت چشمگیری نداشتند. فشارخون سیستولیک در زمان قبل از القای بیهوشی و دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثبت گردید. در بررسی اطلاعات میانگین فشار خون سیستولیک و انجام آزمون‌های تعقیبی ANOVA در زمانهای مختلف، در دقیقه ۳۰ بعد از شروع جراحی اختلاف معنی‌داری در میانگین فشار خون سیستولیک در گروه B با سایر گروه‌ها دیده می‌شود ($P=0/04$). فشارخون دیاستولیک در زمان قبل از القای بیهوشی و دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثبت گردید. در بررسی اطلاعات میانگین فشار خون دیاستولیک و انجام آزمون‌های تعقیبی Anova در زمانهای مختلف، در دقیقه ۳۰ بعد از شروع جراحی اختلاف معنی‌داری در میانگین فشار خون دیاستولیک در گروه B با سایر گروه‌ها دیده می‌شود ($P=0/04$). اختلاف موجود بین سه گروه از نظر میانگین فشارخون سیستولیک

و دیاستولیک به غیر از دقیقه ۳۰ بعد از شروع جراحی در سایر زمانها قابل توجه نبود. همچنین متوسط فشار شریانی در زمان قبل از القای بیهوشی و دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثبت گردید. در بررسی اطلاعات میانگین فشار خون متوسط در زمانهای مختلف، در دقیقه ۶۰ بعد از شروع جراحی اختلاف معنی‌داری در میانگین فشار خون متوسط شریانی در گروه B با سایر گروه‌ها دیده می‌شود ($P=0/04$). اختلاف موجود بین سه گروه از نظر میانگین فشارخون متوسط شریانی به غیر از دقیقه ۶۰ بعد از شروع جراحی در سایر زمانها قابل توجه نبود. هیچگونه گزارشی از عوارض جانبی ترومبوتیک ناشی از دارو در بیماران، (DVT، آمبولی ریه، CAD، CVA) پس از ۲۴ ساعت از عمل وجود نداشت. هیچگونه عارضه‌ای در ریکاوری (تهوع، استفراغ، درد شکم، اسهال و بثورات جلدی) ثبت نشده بود. موارد نیازمند تجویز داروی اضافی (TNG) جهت کنترل بهتر فشار خون ارزیابی گردید. هیچیک از بیماران به داروی اضافی جهت کنترل فشار خون نیاز نداشتند.

جدول ۱: ارزیابی شدت خونریزی براساس معیار بوزارت

نمره	ارزیابی شدت خونریزی بر اساس معیار بوزارت
۰	بدون خونریزی (شرایط شبیه جسد)
۱	خونریزی ناچیز (بدون نیاز به ساکشن)
۲	خونریزی مختصر (ساکشن گهگاه)
۳	خونریزی کم (ساکشن مرتب، چند ثانیه بعد از برداشتن ساکشن فیلد پر از خون می‌شود)
۴	خونریزی متوسط (ساکشن مرتب، بلافاصله بعد از برداشتن ساکشن فیلد پر از خون می‌شود)
۵	خونریزی شدید (با وجود ساکشن مداوم فیلد پر از خون و ادامه جراحی ناممکن می‌شود)

جدول ۲: میزان رضایت جراح براساس معیار لیکرت

رضایت جراح	خیلی بد	بد	متوسط	خوب	عالی
نمره	۱	۲	۳	۴	۵

جدول ۳: ویژگیهای شرکت کنندگان در پایه

متغیرها	A	B	C	P value
سن (سال)	۴۸/۹±۱۳/۴	۴۳/۷±۱۳/۵	۴۰/۶±۱۳/۳	۰/۱۰
وزن (کیلوگرم)	۷۵/۳±۹/۸	۷۹/۱۵±۲/۷	۷۳/۸±۱۰/۶	۰/۲۹
هماتوکریت	۳۹/۵±۴/۵	۳۹/۷±۴/۰	۳۹/۵±۴/۵	۰/۹۹
پلاکت	۲۵۳۸۳۳±۸۲۰۹۵	۲۴۱۰۰۰±۱۱۶۵۹۹	۲۱۶۴۷۶±۴۹۶۲۷	۰/۳۷
PT	۱۲/۶±۰/۸	۱۲/۳±۰/۶	۱۲/۶±۰/۶	۰/۴۳
PTT	۳۰/۲±۱/۳	۲۹/۹±۴/۵	۳۰/۴±۱/۲	۰/۸۵
تعداد ضربان قلب	۷۴/۲۸±۱۱/۴۴	۷۷/۷۲±۱۵/۰۱	۷۹/۸۸±۱۲/۹۵	۰/۴۲
فشار سیستولی	۱۳۴/۲۸ ±۲۶/۰۴	۱۲۷/۰۴±۲۳/۰۴	۱۳۶/۸۸±۲۰/۲۳	۰/۳۰
فشار دیاستولی	۸۴/۵۲±۱۶/۵۸	۷۹/۴۸±۱۵/۰۹	۸۶/۰۴±۱۱/۳۶	۰/۲۵
فشار متوسط شریانی	۹۷/۰۴±۱۷/۲۶	۸۶/۴۶±۲۱/۲۹	۹۶/۴۸±۱۵/۴۱	۰/۰۸

جدول ۴: میانگین میزان خونریزی، تعداد پکدسل تزریقی

P value	C	B	A	
۰/۱۳	۱۳۱/۰±۴۶/۱	۱۵۹/۰±۵۷	۱۷۴/۴±۳۷/۹	مدت جراحی (دقیقه)
۰/۱۲	۴۵۰ (۳۲۰)	۴۱۴ (۲۵۴)	۵۹۴ (۳۸۲)	خون داخل ساکشن
۰/۴۶	۹۳ (۷۴)	۹۵ (۷۳)	۱۱۶ (۶۶)	خون گاز جراحی
۰/۱۴	۵۴۳ (۳۷۱)	۵۰۹ (۳۰۶)	۷۱۰ (۴۱۵)	مجموع خونریزی داخل اتاق عمل
۰/۴۵	۲۰۳ (۱۱۰)	۱۵۵ (۱۴۸)	۲۲۴ (۲۱۷)	خون موجود در درن‌ها در طی ۲۴ ساعت
۰/۱۳	۷۴۶	۶۶۴	۹۳۴	جمع کل خونریزی تا ۲۴ ساعت بعد از جراحی
۰/۱۱	۱/۶۰ (۰/۵۰)	۱/۸۰ (۰/۴۱)	۱/۵۲ (۰/۵۱)	تزریق پکدسل در اتاق عمل
۰/۲۳	۱/۸۸ (۰/۳۳)	۱/۸۰ (۰/۴۱)	۱/۶۸ (۰/۴۸)	تزریق پکدسل در بخش

بحث

به دریافت خون در بیمارانی که ترانگزامیک اسید گرفته بودند آشکارا کاهش یافته بود. جهت قطعی شدن ایمنی استفاده از ترانگزامیک اسید در اعمال جراحی روی ستون فقرات بررسی‌های بیشتری پیشنهاد شده بود (۹ و ۱۰).

در مطالعه‌ی ما، میانگین خونریزی در اثر عمل جراحی با توجه به خون موجود در ساکشن (پس از کسر نمودن سرم شستشو) و گازهای جراحی آغشته به خون (توزین با ترازو) و خون خارج شده از درن جراحی تا ۲۴ ساعت پس از عمل مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به ارقام بدست آمده میانگین کل خونریزی در گروه A (بدون دارو) در اتاق عمل و تا ۲۴ ساعت بعد در بخش بستری، (۹۳۴ سی‌سی) بیشتر از گروه B (۶۶۴ سی‌سی) و گروه C (۷۵۸ سی‌سی) بوده است ولی این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود ($P>0/05$).

در مطالعه‌ی ما، میزان کیفیت موضع جراحی بر اساس معیار بوزارت و میزان رضایتمندی جراح بر اساس معیار لیکرت در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ تعیین گردید. میانه اعداد ثبت شده، محاسبه و مقایسه شدند. در تمام موارد میانه نمره کیفیت جراحی بوزارت ۳ و نمره رضایت لیکرت ۴ (فقط در گروه A در دقیقه ۱۸۰ نمره‌ی ۵ گزارش شد) بود (جدول ۱). براساس نتایج بدست آمده در تمام این دقایق کیفیت موضع جراحی و میزان رضایتمندی جراح براساس معیارهای مربوطه تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند. طول مدت عمل جراحی در ۳ گروه مورد مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. که بطور متوسط ۱۴۶ دقیقه گزارش شد و با توجه به $P=0/13$ ، اختلاف آماری معناداری بین ۳ گروه از نظر طول مدت جراحی مشاهده نشد. در مطالعه‌ی ما، هیچگونه گزارشی از عوارض جانبی ترومبوتیک ناشی از دارو در بیماران، (DVT)، آمبولی ریه، (CVA، CAD) پس از ۲۴ ساعت از عمل وجود نداشت. هیچگونه عارضه‌ای در ریکآوری (تهوع، استفراغ، درد شکم، اسهال و بثورات جلدی) ثبت نشد، بطور کلی این دارو، یک داروی ایمن است. گرچه موارد نادری از تشکیل ترومبوز گزارش شده است ولی در هر حال شواهدی برای افزایش خطر تشکیل

استفاده از عوامل دارویی که تشکیل لخته را تسریع می‌کنند از روشهای کاهش میزان خونریزی در جراحیهای ستون فقرات است. آنالوگهای صنعتی لیزین مثل آمینو کاپروئیک اسید و آپروتینین با مکانیسم کاهش فیبرینولیز باعث کاهش خونریزی حین عمل می‌شوند، اما در بیماران با مشکلات قلبی انجام این کار نگران کننده است (۷). داروی ترانگزامیک اسید به عنوان یک داروی آنتی فیبرینولیتیک با قیمت مناسب، جهت کنترل خونریزی در دسترس می‌باشد. این دارو مشتق سنتتیک اسیدآمینه لیزین بوده و با اثرگذاری روی پلاسمینوژن و ممانعت از تبدیل آن به پلاسمین از فیبرینولیز جلوگیری نموده و باعث پایداری لخته خون می‌شود (۲). یک مطالعه متآنالیز درباره استفاده از ضد فیبرینولیتیکها در بیماران ارتوپدی نشان داد که هر چند هم آپروتینین و هم ترانگزامیک اسید در کاهش از دست رفتن خون موثر هستند، داده‌ها برای نشان دادن تاثیر آمینوکاپروئیک اسید کافی نبود (۶). این مطالعه جهت بررسی اثرات متفاوتی از دوزهای مختلف داروی تزریقی ترانگزامیک اسید در سه گروه مقایسه، گروه پلاسبو، گروه با دوز کم و گروه با دوز بالا طراحی شد. در مطالعه رترواسپکتیو انجام یافته توسط Estefan Endres و همکاران، تعداد ۹۷ بیمار تحت عمل جراحی تنگی دژنراتیو مهره‌های کمری در دو گروه با دریافت ترانگزامیک اسید و بدون دریافت دارو تحت بررسی قرار گرفتند؛ گروه اول ترانگزامیک اسید با دوز ۱ گرم قبل از جراحی و ۱ گرم ۶ و ۱۲ ساعت پس از عمل دریافت کرده بودند. میزان خونریزی در گروه دریافت کننده ترانگزامیک اسید بطور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. همچنین، میزان هموگلوبین پس از عمل (۱۱/۰۸) بالاتر از گروه کنترل (۱۰/۲۹) بود. در این مطالعه به علت میزان کم خونریزی و نیاز به دریافت خون در دو گروه، تفاوت معنی‌داری در ترانسفوزیون خون در دو گروه حاصل نشد (۸).

در یک بررسی متآنالیز توسط Baohui yang و همکاران از دسامبر ۱۹۹۶ تا سپتامبر ۲۰۱۲ بر روی ۹ مطالعه شامل ۵۸۱ بیمار که در حوالی عمل جراحی روی مهره‌ها با ترانگزامیک اسید تحت درمان قرار گرفته بودند، اتلاف خون کمتر بود. همچنین میزان نیاز

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از کلیه افرادی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، اعلام می‌دارد.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی ندارد

منابع مالی

منابع مالی ندارد

منافع متقابل

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

مشارکت مؤلفان

ع م، م ی و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. نویسنده مسئول همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است.

ترومبوز در جراحیهای بزرگ وجود ندارد (۵). در مطالعه Jashvant Poeran و همکاران، از ۵۱۰ بیمارستان در USA تعداد ۸۷۲۴۱۶ بیمار از سال ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۲ که تحت آرتروپلاستی توتال هیپ و زانو قرار گرفته بودند بررسی شدند. بیماران در ۴ گروه قرار گرفتند (بدون تزریق ترانگزامیک اسید، تزریق کمتر یا مساوی ۱۰۰۰ میلی گرم، تزریق ۲۰۰۰ میلی گرم و تزریق بیشتر یا مساوی ۳۰۰۰ میلی گرم).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه نشان داد که در گروههای دریافت کننده دارو نسبت به گروه با عدم دریافت داروی ترانگزامیک اسید، میزان کمتری ترانسفوزیون خون آلوزنیک یا اتولوگ انجام شده بود. همچنین ریسک عوارض ترومبوآمبولیک و نارسایی کلیه و سایر عوارض (CVA، MI و مورتالیتی بیمارستانی) افزایش معنی‌داری نداشت.

قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایاننامه دکتری حرفه‌ای تخصصی بیهوشی و مراقبتهای ویژه به شماره ۰۵۶ می‌باشد. بدینوسیله

References

1. Micael K. Textbook of miller. s anesthesia chapter: anesthesia for orthopedic surgery 2015; (79): 2493.
2. Dunn C J, Goa K L. Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications. *Drugs* 1999; 57(6): 1005-1032. doi: 10.2165/00003495-199957060-00017
3. Krohn C D, Sorensen R, Lange J E, Riise R, Bjornsen S, Brosstad F. Tranexamic acid given into the wound reduces postoperative blood loss by half in major orthopaedic surgery. *The European journal of surgery Supplement: Acta chirurgica Supplement* 2003; 588: 57-61.
4. Kruidering AJT-BGK-M. Pharmacology Examination and Board Review 2013.
5. Wellington K, Wagstaff A J. Tranexamic acid: a review of its use in the management of menorrhagia. *Drugs*. 2003; 63(13): 1417-1433. doi: 10.2165/00003495-200363130-00008
6. Dorosenberg A, Thomas J. Blanck. chapter anesthesia for orthopedic surgery. 6th ed. 2012.
7. Edition mku. chapter: anesthesia for orthopedic surgery. Textbook of miller,s anesthesia 2015; (79): 2403.
8. Endres S, Heinz M, Wilke A. Efficacy of tranexamic acid in reducing blood loss in posterior lumbar spine surgery for degenerative spinal stenosis with instability: a retrospective case control study. *BMC surgery* 2011; 11: 29. doi: 10.1186/1471-2482-11-29
9. Yang B, Li H, Wang D, He X, Zhang C, Yang P. Systematic review and meta-analysis of perioperative intravenous tranexamic acid use in spinal surgery. *PloS one* 2013; 8(2): e55436. doi: 10.1371/journal.pone.0055436
10. Choi W S, Irwin M G, Samman N. The Effect of Tranexamic acid on blood loss during orthognathic surgery: a randomized controlled trial. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009; 67(1): 125-133. doi: 10.1016/j.joms.2008.08.015

Electrochemical determination of malondialdehyde biomarker in exhaled breath condensate using poly arginine functionalized by graphene quantum dots and chitosan

Fozieh Mokhtari¹, Mohammad Hasanzadeh^{2*} , Ahad Mokhtarzadeh³, Nasrin Shadjou⁴

¹Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Nano Technology Research Center, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding author; E-mail: mhmmd_hasanzadeh@yahoo.com hasanzadehm@tbzmed.ac.ir

Received: 19 August 2017 Accepted: 4 November 2017 First Published online: 4 July 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):85-94

Abstract

Background: Lipid peroxidation is a prominent manifestation of free radical activity in biological systems, and it is involved in the development of different diseases such as cancer or cardiovascular and liver diseases. Malondialdehyde (MDA) is globally recognized as a scientifically accepted biomarker of oxidative stress. Due to the significance of MDA as a marker of lipid peroxidation and because of its elevations in various diseases, the assessment of MDA with new and reliable assays, the development of a fast, sensitive, and selective method to detect MDA with simple instruments is necessary.

Methods: This study used the electro polymerization of a low toxic and biocompatible polymer with entitle poly arginine-graphene quantum dots-chitosan (PARG-GQDs-CS) as a novel strategy for surface modification of glassy carbon (GC) surface and preparation a new interface for measurement of MDA in human exhaled breath condensate (EBC). Nanocomposite PARG/CS/GQDs the method of precipitation out of place (ex situ) on the electrode surface was prepared. To verify sequestration nanobiopolymer synthesized Scanning electron microscope images (SEM) were recorded. To identify and study the behavior of malondialdehyde electrochemical methods such as cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry were used.

Results: The scanning electron microscopy (SEM) images indicated immobilization of uniformly CS and GQDs onto PARG film. The modified electrode appeared as an effective electro activity for detection of MDA. Under the optimized analysis conditions and physiological pH, the prepared sensor showed one oxidation processes for MDA at potentials about 1 V vs. Ag/AgCl with a low limit of quantification (LLOQ) 5.94 nM.

Conclusion: The Glassy carbon electrode modified by poly-arginine/chitosan/graphene quantum dots, has good electrical activity for Electro-oxidation malondialdehyde that could be due to synergistic effect poly-arginine, graphene quantum dots and chitosan to create many active sites for this purpose.

Keyword: Malondialdehyde, Biomarker, Poly amino acid, Chitosan, Graphene quantum dots, Nanosensor, Electrochemistry.

How to cite this article: Mokhtari F, Hasanzadeh M, Mokhtarzadeh A, Shadjou N .[Electrochemical determination of malondialdehyde biomarker in exhaled breath condensate using poly arginine functionalized by graphene quantum dots and chitosan]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):85-94. Persian.

مقاله پژوهشی

تعیین مقدار الکتروشیمیایی بیومارکر مالون دی آلدهید در نمونه‌های بازدم انسانی با استفاده از پلی آرژنین عامل‌دار شده با نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان

فوزیه مختاری^۱، محمد حسن زاده^{۲*}، احد مختارزاده^۳، نسرين شادجو^۴

^۱مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴پژوهشکده نانو فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول: ایمیل: hasanzadehm@tbzmed.ac.ir، mhmmmd_hasanzadeh@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۸۵-۹۴

چکیده

زمینه: پراکسیداسیون لیپیدی یک شاخص مهم فعالیت رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های بیولوژیک است و در ایجاد بیماری‌های مختلف مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و کبدی مشارکت دارد. مالون دی آلدهید یکی از فراورده‌های مهم پراکسیداسیون لیپیدی است و به عنوان بیومارکر تشخیصی استرس اکسیداتیو به صورت جهانی پذیرفته شده است. با توجه به اهمیت مالون دی آلدهید به عنوان یک بیومارکر تشخیصی پراکسیداسیون لیپیدها و به دلیل جایگاه آن در بیماری‌های مختلف، تشخیص مالون دی آلدهید با ابزار ساده کار ضروری است.

روش کار: در این مطالعه کاربرد الکتروشیمیایی الکتروکربن شیشه‌ای اصلاح شده با نانوکامپوزیت پلی آرژنین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافن به عنوان پلیمری زیست سازگار و با سمیت کم برای اندازه‌گیری مالون دی آلدهید در نمونه‌های بازدم انسانی بررسی شد. نانوکامپوزیت پلی آرژنین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافن به روش ترسیب خارج از محل بر سطح الکتروکربن تهیه شد. برای تأیید ترسیب نانوبیوپلیمر سنتز شده، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ثبت گردید. جهت تشخیص و بررسی رفتار مالون دی آلدهید از تکنیک‌های الکتروشیمیایی همچون ولتامتری چرخه ای و ولتامتری پالس تفاضلی استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی ثابت می‌کند که پراکندگی نقاط کوانتومی گرافن و کیتوسان بر روی سطح پلی آرژنین با موفقیت انجام شده است. الکتروکربن اصلاح شده فعالیت الکتریکی مناسبی برای تشخیص مالون دی آلدهید نشان می‌دهد. کمترین حد تعیین مقدار برای مالون دی آلدهید در شرایط pH فیزیولوژیک و پتانسیل حدود ۱ ولت نسبت به Ag/AgCl برای سنسور طراحی شده، ۵/۹۴ میلی مولار محاسبه شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهد که الکتروکربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی آرژنین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافن، فعالیت الکتریکی خوبی برای الکترواکسیداسیون مالون دی آلدهید نشان می‌دهد که می‌تواند ناشی از اثر هم‌افزایی پلی آرژنین، نقاط کوانتومی گرافن و کیتوسان در ایجاد سایت‌های فعال فراوان برای این منظور باشد.

کلید واژه ها: مالون دی آلدهید، بیومارکر، پلی آمینواسید، کیتوسان، نقاط کوانتومی گرافن، نانو حسگر، الکتروشیمی

نحوه استناد به این مقاله: مختاری ف، حسن زاده م، مختارزاده ا، شادجو ن. تعیین مقدار الکتروشیمیایی بیومارکر مالون دی آلدهید در نمونه‌های بازدم انسانی با استفاده از پلی آرژنین عامل‌دار شده با نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۸۵-۹۴

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

پراکسیداسیون لیپیدی، شاخص مهم فعالیت رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های بیولوژیک می‌باشد و در ایجاد بیماری‌های مختلف مانند سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و کبدی نقش دارد. مالون دی آلدید، یکی از فراورده‌های مهم پراکسیداسیون لیپیدی است و به عنوان بیومارکر تشخیصی استرس اکسیداتیو به صورت جهانی پذیرفته شده است (۱). مالون دی آلدید به عنوان بیومارکر پراکسیداسیون لیپیدی و همچنین علت بیماری‌های خطرناکی مثل سرطان معده، ریه، پستان و آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی و عروقی مطرح می‌باشد. علاوه بر این سطوح مالون دی آلدید در موجودات زنده جهت مشخص کردن تغییرات مهم در بسیاری از شرایط پاتولوژیک مثل سرطان‌های پستان، ریه، معده و آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی و عروقی به کار می‌رود (۱). اهمیت تشخیص مالون دی آلدید در سرم یا پلاسما انسان می‌تواند از بسیاری از جنبه‌ها مطرح شود. پراکسیداسیون لیپیدی عموماً یک فرآیند ناشی از حمله اکسیدان‌هایی از قبیل رادیکال‌های آزاد یا انواع غیررادیکالی به لیپیدهای دارای باند دوگانه کربن-کربن به خصوص اسیدهای چرب غیراشباع (PUFAs) می‌باشد (۲). پراکسیداسیون لیپیدی یا واکنش اکسیژن با لیپیدهای غیراشباع طیف گسترده‌ای از محصولات اکسیداسیون را تولید می‌کند. در این میان بسیاری از آلدیدهای مختلف که می‌توانند به عنوان محصولات ثانویه در طول پراکسیداسیون لیپیدی تولید شوند، مالون دی آلدید، پروپانال، هگزانال، ۴-هیدروکسی نونال، به طور گسترده توسط استربایر و همکاران در دهه ۸۰ مورد مطالعه قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که مالون دی آلدید بیشترین محصول جهش‌زای پراکسیداسیون لیپیدی است. بر خلاف رادیکال‌هایی که به بیومولکول‌های واقع در فاصله چند نانومتری از محل تولید خود حمله می‌کنند، آلدیدهای مشتق از پراکسیداسیون لیپیدی می‌توانند به راحتی از طریق غشا منتشر شده و بصورت کووالانسی در پروتئین‌های موجود در سیتوپلاسم و هسته، دور از منشا تولیدشان، تغییر ایجاد کنند (۳). تحت شرایط فیزیولوژیک با میزان پایین پراکسیداسیون لیپیدی (شرایط غیرسمی) سلول‌ها بقاء خود را از طریق تشکیل سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی یا فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ تحریک می‌کنند. در مقابل، در پراکسیداسیون‌های لیپیدی متوسط یا بالا (شرایط سمی) سلول‌ها آپوپتوز یا نکروز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) را القا می‌کنند، که هر دو فرآیند سرانجام منجر به آسیب سلولی می‌شود که می‌تواند باعث تسهیل انواع مختلف حالت‌های پاتولوژیک و تسریع روند پیری شود. مالون دی آلدید یا ۳ پروپان دی آل به علت ویژگی‌های کربونیلی از نظر شیمیایی واکنش پذیر است و به راحتی تحت واکنش با مراکز نوکلئوفیلی بیومولکول‌های مختلف شامل DNA و آمینو اسیدهای موجود در پروتئین‌ها قرار می‌گیرد. خواص شیمیایی مالون دی آلدید را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: (۱) اسیدپته ناشی از اتم‌های هیدروژن؛ و (۲) واکنش پذیری دو گروه آلدید آن نسبت به هسته‌های نوکلئوفیل (۴). از سال ۱۹۶۰

تاکنون روش‌های مختلفی جهت تشخیص مالون دی آلدید به منظور کمی کردن سطح استرس اکسیداتیو در بدن و شرایط آزمایشگاهی توسعه یافته است. تکنیک‌های تحلیلی مختلفی جهت تعیین مالون دی آلدید در نمونه‌های بیولوژیک استفاده شده است، این روش‌ها شامل فلورسانس، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با تشخیص آرایه دیود، گاز کروماتوگرافی با طیف سنجی جرمی، طیف سنجی ارتقا یافته سطحی رامان، آشکارسازی رسانایی الکتریکی، الکتروفورز موئین و زیست حسگرهای الکتروشیمیایی هستند. روشی که به طور گسترده استفاده می‌شود براساس تشخیص رنگ محصولات واکنش مالون دی آلدید با تیوباریتوریک اسید (TBA) می‌باشد. اشکال این روش این است که تیوباریتوریک اسید تنها با مالون دی آلدید واکنش نمی‌دهد بلکه با بسیاری دیگر از مواد شیمیایی مانند اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها نیز واکنش می‌دهد، این عامل باعث اختلال در تشخیص ترکیب مالون دی آلدید-تیوباریتوریک اسید می‌گردد. به علاوه تیمار نمونه‌های بیولوژیک در دمای بالا و شرایط اسیدی انجام می‌شود که این باعث می‌شود اکسیداسیون ماتریکس بیشتر اتفاق بیافتد و بنابراین اختلاف در تخمین سطح مالون دی آلدید رخ دهد. بسیاری از روش‌های کروماتوگرافی اختصاصیت و حساسیت بالایی دارند. با این حال نیاز به فرآیندهای استخراج به وسیله کارکنان متخصص، تمیز کردن و بازسازی ستون، استفاده از تجهیزات گران قیمت، آماده کردن نمونه، به ویژه زمانی که از نمونه‌های بیولوژیک استفاده می‌شود، دارند (۱). با توجه به اهمیت مالون دی آلدید به عنوان یک بیومارکر تشخیصی پراکسیداسیون لیپیدها و به دلیل اهمیت آن در بیماری‌های مختلف تشخیص مالون دی آلدید با ابزار ساده کار ضروری است. یوان و همکاران یک حسگر الکتروشیمیایی بدون برچسب بر اساس نانولوله‌های کربنی جهت تشخیص مالون دی آلدید تولید کردند (۵). حسن‌زاده و همکاران از یک فیلم پلی‌تورین به عنوان نانوبیوسنسور الکتروشیمیایی جهت تشخیص مالون دی آلدید در نمونه سرم و هوای بازدم انسان استفاده کردند (۱). در سالهای اخیر، الکترودهای اصلاح شده به وسیله فیلم‌های پلیمری توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به جهت کاربردهای گسترده آنها در زمینه حسگرهای الکتروشیمیایی این چنین فیلم‌های پلیمری می‌توانند باعث بهبود خواص الکتریکی آنالیت، افزایش نرخ فعالیت و بهبود پایداری الکتروود شوند (۶). تا به حال روش‌های گوناگونی برای تهیه الکترودهای اصلاح شده به وسیله فیلم‌های پلیمری از جمله پوشش دادن، پیوند کووالانسی و الکتروپلیمریزیشن استفاده شده است (۷-۱۰). در میان این روش‌ها، الکتروپلیمریزاسیون مولکول‌های آلی و به خصوص اسیدهای آمینه با گروه‌های عاملی مناسب (OH , NH_2 , COOH)، SH و غیره) به عنوان یک ابزار مناسب برای آماده کردن پلیمر سطح الکتروود مطرح است چون این روش‌ها به راحتی توسط تنظیم فاکتورهای الکتروشیمیایی کنترل می‌شوند. براساس

$\text{pH} = 7.4$ استفاده شد، که بعد از تهیه در یک محیط تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. دی پتاسیم فسفات و مونو پتاسیم فسفات از شارلو (Scharlau) به دست آمد. آب مقطر از شرکت دارویی قاضی (تبریز، ایران) خریداری شد. محلول استاندارد ۰/۱ میلی مولار مالون دی آلدهید به صورت روزانه جهت بررسی تست‌های مختلف تهیه شد.

کلیه آزمایش‌های الکتروشیمیایی در یک سل سه الکترودی که شامل الکترود پلاتین، نقره/کلرید نقره، کربن شیشه‌ای به ترتیب به عنوان الکترودهای کمکی، مرجع و کار، متصل به یک سیستم اندازه‌گیری AUTOLAB با پتانسیواستات/گالوانواستات مدل PGSTAT302N محصول شرکت Eco Chemie هلند انجام شد. سیستم توسط کامپیوتر با استفاده از نرم افزار NOVA1.7 کنترل شد. الکترود کار، کربن شیشه‌ای با ضخامت ۲ میلی متر (شرکت آذر الکترود، ایران) بود. مورفولوژی سطح الکترود اصلاح شده با دستگاه SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی) مارک MIRA3FEG/SE ساخت کمپانی Tescan کشور چک مورد بررسی قرار گرفت. یکی از روش‌هایی که طی سال‌های اخیر برای بررسی بیومارکرها مورد توجه قرار گرفته، آنالیز هوای بازدمی می‌باشد (۲۸). استفاده از هوای بازدمی علاوه بر اینکه می‌تواند به خوبی گویای وضعیت فیزیولوژیک فرد باشد، غیر تهاجمی بوده و مورد مقبولیت بیمار نیز است. وجود مارکرها مختلف استرس اکسیداتیو از قبیل محصولات مختلف پراکسیداسیون لیپیدی در هوای بازدمی در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است مطالعات متعددی تا کنون به بررسی میزان مالون دی آلدهید در هوای بازدمی افراد با بیماریهای مختلف پرداخته‌اند (۲۹-۳۰). نمونه‌های هوای بازدم مایع شده از داوطلبان سالم (بدون سابقه هر گونه بیماری، عدم استعمال دخانیات، الکل، کافئین، و دارو) با استفاده از دستگاه نمونه‌گیری بازدم ثبت شده در دفتر ثبت اختراع ملی، در مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در مهر سال ۹۵ جمع‌آوری شد. هوای بازدم تا دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد خنک و تغلیظ شد. ۱ میلی لیتر نمونه بازدم انسانی مایع شده از یک داوطلب سالم به فلاسک به حجم ۱۰ میلی لیتر منتقل شد. جهت تهیه نانوکامپوزیت پلی‌آرژنین/کیتوسان/ نقاط کوانتومی گرافنی ابتدا الکترود کربن شیشه‌ای با قطر ۲ میلی‌متر با استفاده از آلومینای ۰/۳ و ۰/۵ میکرومتر صیقل داده شد و برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی از محلول آلومینا و به طور کامل دو بار با آب دیونیزه شده شستشو داده شد. سپس به طور پی‌درپی در استون و آب مقطر به صورت التراسوند قرار گرفته و اجازه داده شد در دمای اتاق خشک شود. ابتدا ۵ میلی‌لیتر از محلول آرژنین ۰/۵ میلی مولار برداشته و به داخل سل الکتروشیمیایی انتقال داده می‌شود. با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای، پلی‌آرژنین بر روی الکترود کربن شیشه‌ای در پتانسیل ۱/۵- تا ۲ ولت و با سرعت رویش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه و با تکرار ۲۰ چرخه لایه نشانی می‌شود. سپس در مرحله دوم بعد از شستشوی الکترود با آب مقطر، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کیتوسان به

ویژگی‌های الکترودهای اصلاح‌شده به وسیله پلیمرها به خوبی می‌توان ضخامت و بار این پلیمرها را تعریف کرد. همچنین آماده کردن این حسگرها به دلیل تهیه آسان به روش الکتروپلیمریزاسیون، کم هزینه می‌باشد (۱۱-۱۶). تلفیق مزایای نانوساختارها با تکنیک‌های الکتروشیمیایی در زیست حسگرها در سال‌های اخیر موجب پیشرفت‌های چشمگیر در حساسیت و قدرت آنالیزی این سیستم‌ها شده است. اثبات شده است که با بکارگیری مواد پیشرفته همچون نانو لوله‌های کربنی، مزوپروس‌های سیلیکاتی، گرافن و مشتقات آنها، نقاط کوانتومی و... در ساختار نانو حسگرها، کارایی به لحاظ سرعت، دقت، میزان آنالیت مصرفی و توان عملیاتی افزایش می‌یابد (۱۷). یکی از بهترین نامزدها برای این منظور نقاط کوانتومی گرافنی است. نقاط کوانتومی گرافنی بدلیل داشتن ویژگی‌های عالی نظیر خاصیت فوتولومینسانس و فلورسانس مطلوب، حلالیت در محلول‌های آبی، سمیت پایین، زیست سازگاری (۱۸) و خصوصیات منحصر بفرد دیگری همچون خصلت مکانیکی، الکتریکی، دمایی، اپتیکی، مساحت سطحی بسیار بالا و امکان کنترل تمام این ویژگی‌ها از طریق عاملدار کردن شیمیایی، مورد توجه محققین می‌باشد (۱۹، ۲۰). از سوی دیگر، رسوب نقاط کوانتومی گرافنی بر روی برخی از مواد پلیمری توجه زیادی به خود جذب کرده است. با این حال، فیلمهای پلیمری بر اساس اسیدهای آمینه بسیار شکننده هستند، در نتیجه استفاده از بتا سیکلودکسترین و کیتوسان و سایر مواد محکم برای بی حرکتی نقاط کوانتومی گرافنی در سطح پلیمر مطرح شده است (۲۱). کیتوسان از فراوان‌ترین آمینوپلی‌ساکاریدها در طبیعت، دارای ساختاری بی‌نظیر و خصوصیات چند منظوره می‌باشد. کیتوسان توجه زیادی را به‌خصوص در صنایع پزشکی و دارویی به خود جلب کرده است. از مهمترین خصوصیات که آن را مناسب برای این کاربردها کرده است می‌توان به زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و غیرسمی بودن آن اشاره کرد. کیتوسان معمولاً به دلیل توانایی تشکیل فیلم، نفوذپذیری بالای آب، انتقال یونی سریع و قابلیت چسبندگی به سطوح هیدروفیل و سهولت تغییرات شیمیایی و به دلیل حضور گروه‌های آمینی و هیدروکسیل به عنوان ماتریکس ساکن برای توسعه حسگر انتخاب می‌شود (۲۲-۲۵). اضافه کردن نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان به ساختار پلی‌آرژنین می‌تواند یک فیلم نازک رسانای الکتریکی عالی در جهت تقویت جریان فارادی ایجاد کند (۲۶، ۲۷). در نتیجه در این مطالعه یک رابط سازگار با محیط زیست و با سمیت کم از پلی‌آرژنین/کیتوسان/ نقاط کوانتومی گرافنی به عنوان نانوکامپوزیت سه تایی با استفاده از روش‌های الکتروشیمیایی تهیه و فعالیت الکتریکی آن نسبت به الکترواکسیداسیون MDA بررسی خواهد شد.

روش کار

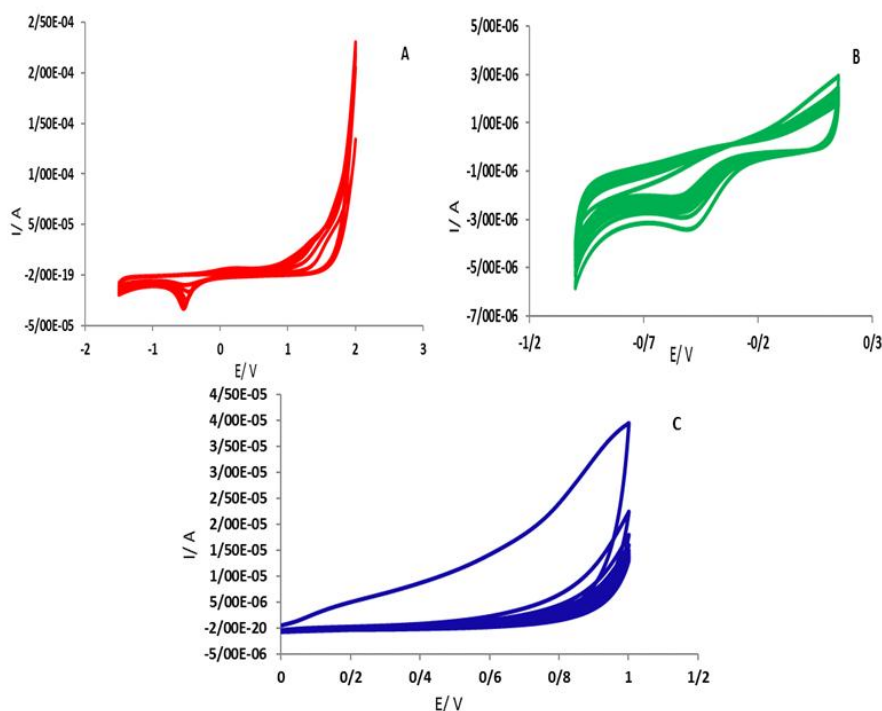
در این پژوهش، ال-آرژنین از سیگما آلد ریچ تهیه شد. در تمامی قسمت‌های این مطالعه از محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با

جانبی آمینی و هیدروکسیل پیوند داده و منجر به تشکیل شبکه‌های متمایز بین زنجیره‌های کیتوسان شود. لذا در ادامه کار کیتوسان و بدنال آن نقاط کوانتومی گرافنی بر روی سطح پلی‌آرژینین ترسیب شدند. تصویرهای به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، تشکیل فیلم پلیمری در سطح الکتروود را نشان می‌دهد. الکتروپلیمریزاسیون مستقیم پلی‌آرژینین بر روی الکتروود کربن شیشه‌ای به صورت یک ماتریکس با پراکندگی مشاهده می‌شود (شکل ۲-۱). همچنین اندازه ذرات در نواحی مختلف تعیین شده که میانگین آن در حدود ۲۵ نانومتر می‌باشد. لذا فیلم پلی‌آرژینین در مقیاس نانومتری بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای پلیمریزه می‌شود. گروه‌های حاوی آمین در کیتوسان می‌تواند مقدار زیادی سایت‌های فعال برای رسوب بر روی نقاط کوانتومی گرافنی فراهم کند. از طرف دیگر گروه‌های حاوی اکسیژن بر روی نقاط کوانتومی گرافنی برای ترکیب الکتروودهای خارجی با کیتوسان از دیدگاه نقطه الکترواستاتیک مفید هستند. در نتیجه، با برهمکنش باند هیدروژن پلی‌آرژینین با کیتوسان و به دنبال آن برهمکنش الکترواستاتیک کیتوسان با نقاط کوانتومی گرافنی، یک فیلم با سمیت کم و زیست سازگار بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای ساخته می‌شود.

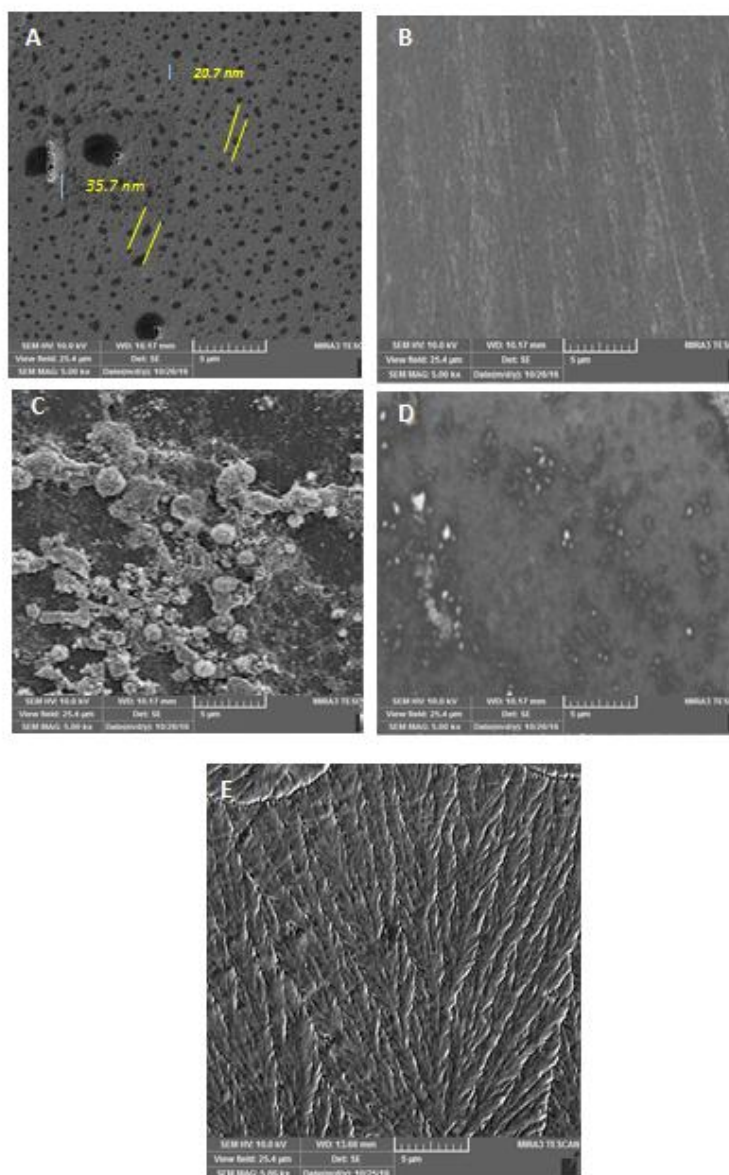
داخل سل الکتروشیمیایی انتقال می‌دهیم. توسط تکنیک ولتامتری چرخه‌ای در پتانسیل ۱- تا ۰/۱۵ ولت با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه و با تکرار ۲۰ چرخه کیتوسان بر روی الکتروود لایه نشانی می‌شود. در مرحله آخر مانند مرحله قبل بعد از شستشوی الکتروود با آب مقطر و انتقال محلول نقاط کوانتومی گرافنی به سل، نقاط کوانتومی گرافنی با تکنیک ولتامتری چرخه‌ای، در محدوده پتانسیل ۰ تا ۱ ولت و سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه، با تکرار ۳۰ چرخه نیز بر روی الکتروود لایه نشانی می‌شود. الکترودهای اصلاح شده با پلی‌آرژینین و پلی‌آرژینین/نقاط کوانتومی گرافنی نیز به طور جداگانه تهیه و نتایج حاصل از سه الکتروود اصلاح شده باهم مقایسه می‌گردد.

یافته

شکل ۱-۱ و ۱-۲ ولتاموگرام چرخه‌ای پلیمریزاسیون الکتروشیمیایی ال-آرژینین بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای را نشان می‌دهد. ال-آرژینین دارای دو گروه NH_2 و دو گروه NH می‌باشد که می‌توانند به راحتی به NH_2 اکسید شوند؛ بنابراین پیوند کوالانسی (C-N) ممکن است بین الکتروود کربنی و گروه آلفا آمین از آرژینین تشکیل شده باشد. با عنایت به اینکه کیتوسان آلدوست است، لذا می‌تواند با نقاط کوانتومی گرافنی از طریق گروه‌های



شکل ۱: (A) ولتامتری چرخه‌ای برای پلیمریزاسیون الکتروشیمیایی ال-آرژینین بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه در محدوده ۰/۱۵-۱ ولت با تعداد ۲۰ چرخه. (B) ولتامتری چرخه‌ای برای پلیمریزاسیون الکتروشیمیایی کیتوسان بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه در محدوده ۰/۱۵-۱ ولت با تعداد ۲۰ چرخه. (C) ولتامتری چرخه‌ای برای ترسیب الکتروشیمیایی نقاط کوانتومی گرافنی بر روی سطح الکتروود کربن شیشه‌ای با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه در محدوده ۰ تا ۱ ولت با تعداد ۳۰ چرخه.



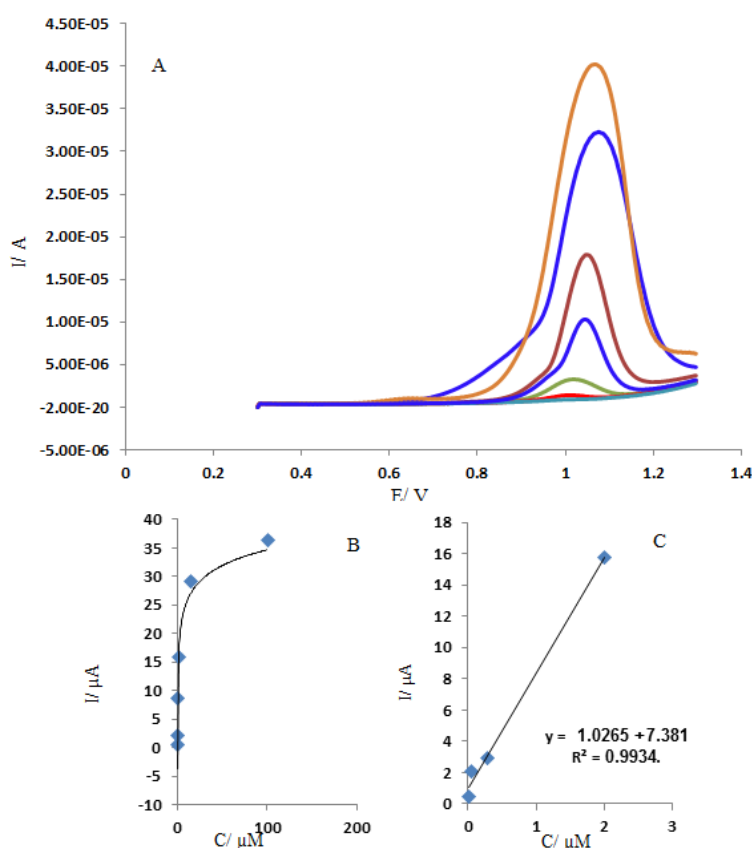
شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژنین (A) و از سطح الکترود کربن شیشه‌ای (B). الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژنین / نقاط کوانتومی گرافنی (C) و الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نقاط کوانتومی گرافنی (D) و الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژنین / کیتوسان / نقاط کوانتومی گرافنی (E).

می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که الکترود اصلاح شده با پلی‌آرژنین/کیتوسان/ نقاط کوانتومی گرافنی عملکرد بهتری برای اکسیداسیون مالون دی‌آلدهید نسبت به الکترود اصلاح شده با نقاط کوانتومی گرافنی و الکترود اصلاح شده با پلی‌آرژنین ارائه می‌دهد. از مطالب بالا می‌توان نتیجه گرفت که نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان می‌تواند یک مرکز شتاب برای انتقال الکترون را ایجاد کنند. این نتایج نشان می‌دهد که فیلم پلی‌آرژنین/کیتوسان/ نقاط کوانتومی گرافنی می‌تواند باعث تسریع انتقال الکترون مالون دی‌آلدهید و فعالیت‌های الکتروکاتالیتیکی برای واکنش‌های

ولتاموگرام‌های چرخه‌ای الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نقاط کوانتومی گرافنی، الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژنین و الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژنین/کیتوسان/ نقاط کوانتومی گرافنی، در حضور ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات با $\text{pH} = 7.4$ و ۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد مالون دی‌آلدهید در محدوده پتانسیلی ۱- تا ۱ ولت با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه ثبت گردید. نتایج نشان دادند که بر روی الکترود کربن شیشه‌ای اصلاح نشده هیچ رفتار اکسیداسیون و کاهش مشاهده نمی‌شود که نشان دهنده عدم فعالیت الکترواکتیویتی آن

کمتر مالون دی آلدهید و با جریان زمینه کمتر نسبت روش ولتامتری چرخه‌ای بدست آمده. با توجه به نتایج به دست آمده، از این تکنیک برای تجزیه و تحلیل کمی مالون دی آلدهید استفاده شد. شکل ۳، ولتامتری پالس تفاضلی الکتروکربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژینین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافنی برای تعیین مقدار مالون دی آلدهید در بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH}=7/4$ در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. منحنی کالیبراسیون مالون دی آلدهید در بافر فسفات، توسط ولتامتری پالس تفاضلی بدست آمد (شکل ۳-B و ۳-C). کمترین حد تعیین مقدار (LLOQ) برای مالون دی آلدهید، ۵/۹۴ میلی مولار محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که فیلم پلی‌آرژینین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافنی، فعالیت الکتریکی خوبی برای اکسیداسیون مالون دی آلدهید نشان می‌دهد که می‌تواند ناشی از اثر هم‌افزایی پلی‌آرژینین، نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان در ایجاد سایت‌های فعال فراوان برای این منظور باشد.

اکسیداسیون و احیا، بنابراین فیلم پلی‌آرژینین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافنی یک حدواسط مناسب برای انتقال الکترون بین مالون دی آلدهید و الکتروکد کار می‌باشد که ممکن است با مشخصات مناسب آن مثل مساحت سطح هندسی بالا و رسانایی الکتریکی بالا مرتبط باشد. در این شکی نیست که نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان نقش مهمی را جهت بهبود فعالیت الکتروکاتالیتی پلی‌آرژینین جهت الکترواکسیداسیون مالون دی آلدهید بازی می‌کنند. نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان به عنوان یک جزء فعال الکتریکی در فیلم پلیمری، یک سطح کاتالیستی برای تشخیص مالون دی آلدهید ایجاد می‌کند. در ضمن کیتوسان می‌تواند تقویت سیگنال‌های الکتروشیمیایی به وجود آمده در طول فرآیند تشخیص الکتروشیمیایی را ایجاد کند. از طرف دیگر، اثر هم‌افزایی استفاده همزمان از نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان منجر به تشخیص موفقیت آمیز و تعیین مالون دی آلدهید می‌گردد. از روش ولتامتری پالس تفاضلی برای تشخیص مالون دی آلدهید استفاده شد زیرا پیک‌های واضح‌تر و بهتر در غلظت‌های



شکل ۳: (A) ولتامتری پالس تفاضلی الکتروکربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژینین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافنی برای تعیین مالون دی آلدهید در بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH}=7/4$ در غلظت‌های: ۰/۰۰۰۰۵۹۴، ۰/۰۰۰۰۴۱۶، ۰/۰۰۰۰۲۹۱، ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۱۴، ۰/۰۰۰۱ میکرومولار. (B) منحنی کالیبراسیون مالون دی آلدهید در غلظت‌های ذکر شده در بالا. (C) منحنی کالیبراسیون مالون دی آلدهید در غلظت‌های پایین.

می‌تواند فرصت‌های جدیدی را برای گسترش استفاده کاربردی پلی‌آمینواسیدها در زمینه سنجش الکتروشیمیایی باز کند. همچنین، اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید، در نمونه بازدم انسانی مایع شده، جمع‌آوری شده توسط سیستم خنک‌کننده هوای بازدم، به عنوان یک تکنیک جدید استفاده گردید که به عنوان روشی غیرتهاجمی و با توجه به سایر مزیت‌های آن نسبت به خون، سرم، ادرار و غیره موفقیت آمیز می‌باشد.

قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران (NIMAD) با شماره گرنت ۹۶/۹۴۳ به جهت حمایت‌های مالی از این پژوهش اعلام می‌دارد. همچنین از کلیه دست‌اندرکاران این مقاله که در بخش تجربی و نوشتن مقاله مشارکت داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

عدم وجود کارآزمایی بالینی

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی از طرف مرکز تحقیقات کاربردی دارویی صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

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

مشارکت مؤلفان

ف.م.، ح.ا.، م.ن. ش.طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. همچنین نامبرداران مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

هوای بازدم مایع شده (EBC)، جمع‌آوری شده توسط سیستم خنک‌کننده هوای بازدم تحت شرایط تنفس عادی فرد داوطلب، یک تکنیک جدید می‌باشد که به عنوان روشی غیرتهاجمی و با توجه به سایر مزیت‌های آن نسبت به خون، سرم، ادرار و در تشخیص بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. برای تشخیص مالون دی‌آلدهید در بازدم انسانی مایع شده از نمونه بازدم مایع شده فرد سالم، ۴ غلظت مختلف مالون دی‌آلدهید به وسیله محلول استاندارد آماده گردید و نتایج بدست آمده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: نتایج مشاهده شده برای تشخیص مالون دی‌آلدهید در نمونه هوای بازدم مایع شده انسانی به وسیله الکتروکربن شیشه‌ای اصلاح شده با پلی‌آرژنین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافنی

سیگنال/میکروآمپر	غلظت/میکرومولار
۲/۷۳	۲۶۰۰۰
۰/۴۵۸	۳۷۱
۰/۳۰۸	۵۳
۰/۲۰۱	۷۶

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه در این مطالعه کاربرد الکتروشیمیایی الکتروکربن شیشه‌ای اصلاح‌شده با نانوکامپوزیت پلی‌آرژنین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافنی (PARG/CS/GQDs) برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید در نمونه‌های بازدم انسانی بررسی شد. فیلم نازک پلی‌آرژنین/کیتوسان/نقاط کوانتومی گرافنی، مزایای پلی‌آرژنین (به عنوان یک نانوبیوپلیمر نیمه‌رسانا)، نقاط کوانتومی گرافنی (دارای هدایت الکتریکی عالی) و کیتوسان (به عنوان یک عامل زیست سازگار) را با هم ترکیب می‌کند. از همه مهمتر، از نانو حسگر پیشنهادی برای تعیین مقدار مالون دی‌آلدهید در pH فیزیولوژیک، بدون نیاز به پیش تیمار نمونه یا هر نوع فرایند استخراج یا تبخیر زمان‌بر، با نتایج رضایت بخش استفاده شد. نتایج نشان دادند که، ترکیبی از پلی‌آمینواسیدها با نقاط کوانتومی گرافنی و کیتوسان

References

1. Zamani-Kalajahi M, Hasanzadeh M, Shadjou N, Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban-Gharamaleki V, et al. Electrodeposition of taurine on gold surface and electro-oxidation of malondialdehyde *Surf Eng* 2015; **31**(3): 194-201. doi: 10.1179/1743294414Y.00000000349
2. Yin H, Xu L, Porter N A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011; **111**(10): 5944-5972. doi: 10.1021/cr200084z
3. Ayala A, Muñoz M F, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; **2014**: 23-28. doi: 10.1155/2014/360438
4. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 2017; **524**: 13-30. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021
5. Yuan L, Lan Y, Han M, Bao J, Tu W, Dai Z. Label-free and facile electrochemical biosensing using carbon nanotubes for malondialdehyde detection. *Analyst* 2013; **138**(11): 3131-3134. doi: 10.1039/c3an00041a

6. Chen X, Ma Y, Chen D, Ma M, Li C. Electrochemical fabrication of polymerized imidazole-based ionic liquid bearing pyrrole moiety for sensitive determination of hexestrol in chicken meat. *Food chem* 2015; **180**: 142-149. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.038
7. Shahrokhian S, Karimi M, Khajehsharifi H. Carbon-paste electrode modified with cobalt-5-nitroisalophen as a sensitive voltammetric sensor for detection of captopril. *Sens Actuators B Chem* 2005; **109**(2): 278-284. doi: 10.1016/j.snb.2004.12.059
8. Sun H, Wu L, Wei W, Qu X. Recent advances in graphene quantum dots for sensing. *Mater Today* 2013; **16**(11): 433-442. doi: 10.1016/j.mattod.2013.10.020
9. Tang H, Yan F, Lin P, Xu J, Chan H L. Highly sensitive glucose biosensors based on organic electrochemical transistors using platinum gate electrodes modified with enzyme and nanomaterials. *Adv Funct Mater* 2011; **21**(12): 2264-2272. doi: 10.1002/adfm.201002117
10. Wang K, Sun Z, Feng M, Liu A, Yang S, Chen Y, et al. Design of a sandwich-mode amperometric biosensor for detection of PML/RAR α fusion gene using locked nucleic acids on gold electrode. *Biosens Bioelectron* 2011; **26**(6): 2870-2876. doi: 10.1016/j.bios.2010.11.030
11. Beitollahi H, Sheikhsheae I. Electrochemical behavior of carbon nanotube/Mn (III) salen doped carbon paste electrode and its application for sensitive determination of N-acetylcysteine in the presence of folic acid. *Int J Electrochem Sci* 2012; **7**: 7684-7698.
12. Cosnier S. Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films. *Appl Biochem Biotechnol* 2000; **89**(2-3): 127-138.
13. Lupu S, del Campo F J, Muñoz F X. Development of microelectrode arrays modified with inorganic-organic composite materials for dopamine electroanalysis. *J Electroanal Chem* 2010; **639**(1): 147-153. doi: 10.1016/j.jelechem.2009.12.003
14. Niu L, Lian K, Kang W, Li S. Characterization of poly (safranin T)-modified electrode and application for simultaneous determination of epinephrine and uric acid coexisting with ascorbic acid. *J Braz Chem Soc* 2011; **22**(2): 204-210. doi: 10.1590/S0103-50532011000200003
15. Areias MC, Shimizu K, Compton RG. Voltammetric detection of captopril using copper (II) and an unmodified glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 2016; **28**(7): 1524-1529. doi: 10.1002/elan.201501156
16. Lu S, Lu P, Li C, Wang C, Yu J. Highly improved electrooxidation of captopril on copper hexacyano ferrate/ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode. *Aust J Chem* 2014; **67**(6): 851-857. doi: 10.1071/CH13650
17. Noroozifar M, Khorasani-Motlagh M, Nadiki H H, Hadavi M S, Foroughi M M. Modified fluorine-doped tin oxide electrode with inorganic ruthenium red dye-multiwalled carbon nanotubes for simultaneous determination of a dopamine, uric acid, and tryptophan. *Sens Actuators B Chem* 2014; **204**: 333-341. doi: 10.1016/j.snb.2014.07.060
18. Jian X, Liu X, Yang H-m, Guo M-m, Song X-l, Dai H-y, et al. Graphene quantum dots modified glassy carbon electrode via electrostatic self-assembly strategy and its application. *Electrochim Acta* 2016; **190**: 455-462. doi: 10.1016/j.electacta.2016.01.045
19. Zhang P, Zhao X, Ji Y, Ouyang Z, Wen X, Li J, et al. Electrospinning graphene quantum dots into a nanofibrous membrane for dual-purpose fluorescent and electrochemical biosensors. *J Mater Chem B* 2015; **3**(12): 2487-2496. doi: 10.1039/C4TB02092H
20. Hasanzadeh M, Karim-Nezhad G, Shadjou N, Hajjizadeh M, Khalilzadeh B, Saghatforoush L, et al. Cobalt hydroxide nanoparticles modified glassy carbon electrode as a biosensor for electrooxidation and determination of some amino acids. *Anal Biochem* 2009; **389**(2): 130-137. doi: 10.1016/j.ab.2009.03.024
21. Zhao J, Chen G, Zhu L, Li G. Graphene quantum dots-based platform for the fabrication of electrochemical biosensors. *Electrochem commun* 2011; **13**(1): 31-33. doi: 10.1016/j.elecom.2010.11.005
22. Li Y, Wu K, Zhitomirsky I. Electrodeposition of composite zinc oxide-chitosan films. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2010; **356**(1): 63-70. doi: 10.1016/j.colsurfa.2009.12.037
23. Lei L, Cao Z, Xie Q, Fu Y, Tan Y, Ma M, et al. One-pot electrodeposition of 3-aminopropyltriethoxysilane-chitosan hybrid gel film to immobilize glucose oxidase for biosensing. *Sens Actuators B Chem* 2011; **157**(1): 282-289. doi: 10.1016/j.snb.2011.03.063
24. Zeng X, Li X, Xing L, Liu X, Luo S, Wei W, et al. Electrodeposition of chitosan-ionic liquid-glucose oxidase biocomposite onto nano-gold electrode for amperometric glucose sensing. *Biosens Bioelectron* 2009; **24**(9): 2898-2903. doi: 10.1016/j.bios.2009.02.027
25. Hasanzadeh M, Shadjou N, Marandi M. Graphene quantum dot functionalized by chitosan and beta-cyclodextrin as a new support nanocomposite material for efficient methanol electrooxidation. *J Alloys Compd* 2016; **688**: 171-186. doi: 10.1016/j.jallcom.2016.07.202
26. Ou J, Tao Y, Xue J, Kong Y, Dai J, Deng L. Electrochemical enantio-recognition of tryptophan enantiomers based on graphene quantum dots-chitosan composite film. *Electrochem commun* 2015; **57**: 5-9. doi: 10.1016/j.elecom.2015.04.004
27. Shadjou N, Hasanzadeh M, Marandi M, Hasanzadeh A. Graphene quantum dot functionalized by chitosan

- as an electrically conductive nano-material toward low potential detection: a new platform for interface science. *J Mater Sci* 2016; **27**(11): 11834-11843. doi: 10.1007/s10854-016-5324-5
28. Risby T H, Solga S. Current status of clinical breath analysis. *Appl Phys B* 2006; **85**(2): 421-426. doi: 10.1007/s00340-006-2280-4
29. Guentsch A, Preshaw P M, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch B W. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig* 2008; **12**(4): 345. doi: 10.1007/s00784-008-0202-z
30. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Najmanová V, Fenclová Z, Vlčková Š, et al. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. *J Chromatogr B* 2009; **877**(24): 2477-2486. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.06.008

Electrical Absorption of *Staphylococcus aureus* in Liquid Culture Medium

Mohammad Reza Nahaei^{1,2*}, Hassan Amini¹, Atabak Asvadi Kermani¹, Naiereh Didevar², Behnam Amini³,
Mohammad Akbari Dibavar²

¹Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

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

³School of Management and Medical Information, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

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

Received: 12 July 2017 Accepted: 18 September 2017 First Published online: 4 July 2019

Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):95-100

Abstract

Background: All microorganisms are negatively charged using the sulfate groups in acid mucopolysaccharids, ionized phosphate groups of the phospholipids and some other chemical groups on their surfaces. Recent researches concerning the effect of electrical fields on the biologic processes, anti-inflammatory and carcinogenic effects provides a good opportunity to investigate whether these fields can gravitate or repel the microorganisms or not, therefore in this experimental study electrical gravitation of *Staphylococcus aureus* in liquid culture medium was investigated.

Methods: To make the electrical field a plastic tank with positive electrode (cathode) and negative electrode (anode) was constructed on the either sides. Afterwards the tank was filled with sterile nutrient broth medium and *S. aureus* ATCC 29213 was cultured. For homogenization of the bacteria in all parts of the medium, the medium was stirred and positive and negative charges were generated in the poles of the tank. After 24 hours, sampling was performed from different parts of the tank and the samples were cultured in nutrient agar medium. This experiment repeated three times in the same manner and the average results were calculated.

Results: Average results of bacterial counts on samples taken from different parts of the tank with an electrical field intensity of 20 Nm/colon in all three experiments showed that the numbers of *S. aureus* near the positive electrode was 8.2×10^3 CFU/ml, in the middle of the medium was 6.2×10^3 CFU/ml and near the negative electrode was 3.6×10^3 CFU/ml.

Conclusion: The electrical fields caused *S. aureus* gravitation towards positive electrode.

Keyword: Electrostatic potential (zeta potential), Negative surface charge, Electric potential difference, Electric power supply, *Staphylococcus aureus*.

How to cite this article: Nahaei M R, Amini H, Asvadi Kermani A, Didevar N, Amini B, Akbari Dibavar M. [Electrical Absorption of *Staphylococcus aureus* in Liquid Culture Medium]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):95-100. Persian.

مقاله پژوهشی

جذب الکتریکی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مایع

محمد رضا نهائی^{۱*}، حسن امینی^۱، اتابک اسودی کرمانی^۱، نیره دیده ور^۲، بهنام امینی^۲، محمد اکبری دیباور^۲

^۱مرکز تحقیقات هماتولوژی و اونکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲گروه آموزشی میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
^۳دانشکده مدیریت و اطلاع رسانی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
نویسنده مسئول: ایمیل nahaeim@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۹۵-۱۰۰

چکیده

زمینه: همهی میکروارگانیسم‌ها به دلیل داشتن گروههای سولفات در اسید موکوپلی ساکاریدها و نیز گروههای فسفات یونیزه در فسفولیپیدها و برخی گروههای شیمیایی دیگر دارای بار الکتریکی منفی در سطح خود هستند و از طرفی پژوهش‌های رو به گسترش در خصوص تأثیر میدانهای الکتریکی بر روی زندگی بیولوژیک از اثرات ضد التهابی گرفته تا اثرات کارسینوژن، بستر مناسبی را جهت بررسی این سوال که آیا این میدانها می‌توانند موجب جذب یا دفع میکروارگانیسم‌ها گردند، فراهم می‌سازد. لذا در این مطالعه جذب الکتریکی استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مایع مورد تجسس قرار گرفت.

روش کار: جهت ایجاد میدان الکتریکی از تانک پلاستیکی استفاده شد که در دو طرف آن الکترود مثبت (کاتد) و الکترود منفی (آنود) تعبیه گردید. پس از استریل سازی، تانک تهیه شده با محیط کشت مایع نوترینت براث پر شد و باکتری مورد مطالعه (*S.aureus* ATCC 29213) در آن کشت گردید و جهت پخش یکسان باکتری در قسمتهای مختلف بوسیله لوپ، مایع درون تانک بهم زده شد. سپس با اتصال به جریان الکتریسیته شارژ مثبت و منفی در دو قطب تانک ایجاد شد. بعد از ۲۴ ساعت از رشد باکتری از مناطق مختلف تانک نمونه برداری شده و نسبت به شمارش باکتری‌ها از مناطق مختلف نمونه برداری بعمل آمده و در محیط کشت نوترینت آگار کشت گردید. آزمایش فوق سه بار در شرایط یکسان تکرار و میانگین نتایج بدست آمده محاسبه گردید.

یافته‌ها: نتایج میانگین شمارش باکتری بر روی نمونه‌های برداشته شده از مناطق مختلف تانک با میدانهای الکتریکی با شدت ۲۰ نیوتن بر کولون، در سه بار آزمایش بعمل آمده نشان داد که تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در سمت الکترود مثبت $10^2 \times 1/2$ CFU/ml در وسط تانک $10^3 \times 6/2$ CFU/ml و در سمت الکترود منفی $10^3 \times 3/6$ CFU/ml بود.

نتیجه گیری: مقایسه نتایج بدست آمده بر روی تعداد باکتریها در سمت الکترود مثبت، الکترود منفی و وسط تانک نشانگر تأثیر مستقیم این میدانها در جابجایی و جذب باکتری‌ها به سمت الکترود مثبت بود.

کلید واژه‌ها: پتانسیل الکترواستاتیک (پتانسیل زتا)، شارژ سطحی منفی، اختلاف پتانسیل الکتریکی، منبع تغذیه الکتریکی، استافیلوکوکوس اورئوس.

نحوه استناد به این مقاله: نهائی م ر، امینی ح، اسودی کرمانی ا، دیده ور ن، امینی ب، اکبری دیباور م. جذب الکتریکی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مایع. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۹۵-۱۰۰

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

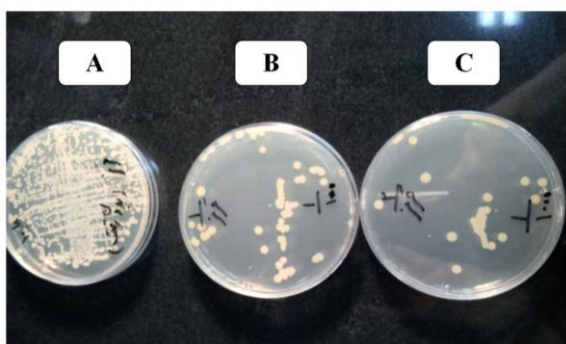
پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها شبکه‌ای از بار الکتریکی منفی را در سطح خود دارند که افینیتی انتخابی و اتصال بین سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این شبکه با داشتن بار الکتریکی در بدخیمی‌ها، توان متابولیکی، افینیتی داروها و حتی در ارتباط بین انگل و میزبان نقش مهمی را ایفا می‌کند (۷-۱). خواص هیدروفوبیک و الکتریکی داروها نیز در توزیع داروها در بافت‌های زنده مؤثر است (۸). نتایج مطالعات قبلی انجام شده نشان می‌دهند که از محتمل‌ترین موارد برای جایگاه‌های آنیونی در غشای سلول‌ها می‌توان به گروه‌های سولفات موجود در اسید موکو پلی‌ساکاریدها و گروه‌های فسفات یونیزه در فسفولیپیدها و گروه‌های کربوکسیل باردار که ناشی از حضور اسیدسیالیک هستند (یا ناشی از گروه‌های کربوکسیل موجود در استیک آمینو اسید پروتئین) اشاره کرد (۱۳-۶). علاوه بر موارد فوق از دیگر عوامل ایجاد کننده‌ی شارژ سطحی منفی، می‌توان به پتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها اشاره کرد که در باکتری‌های گرم مثبت تا ۴۰ لایه پتیدوگلیکان وجود دارد که حدود ۵۰٪ از لایه دیواره سلولی را تشکیل می‌دهد. این ترکیب در باکتری‌های گرم منفی نیز به نظر می‌رسد فقط یک یا دو لایه باشد که ۵ تا ۱۰٪ ماده دیواره سلولی را تشکیل می‌دهد (۱۴). مورد دیگر که اکثراً در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت یافت می‌شود اسیدهای تیکوئیک و تیکوروئیک می‌باشد که ممکن است تا ۵۰٪ وزن خشک دیواره و ۱۰٪ وزن خشک کل سلول را به خود اختصاص دهد. اصطلاح اسید تیکوئیک مشتمل بر تمامی دیواره غشا یا پلیمرهای کپسولی حاوی گلیسروفسفات یا ریبیتول فسفات است، که بار منفی دارند؛ اسیدهای تیکوئیک به طور مشابه تا حدودی مسئول بار منفی سطح سلول هستند. عمدتاً دو نوع اسید تیکوئیک بنام‌های اسید تیکوئیک دیواره (Wall teichoic acid, WTA) و اسید لیپوتیکوئیک (Lipoteichoic acid, LTA) وجود دارند. WTA و LTA توأم با پتیدوگلیکان، شبکه یا ماتریکس پل آنیونی را به وجود می‌آورند که فراهم کننده‌ی عملکردهای مربوط به انعطاف‌پذیری، حفره‌دار بودن، قدرت الاستیسیته و خصوصیات الکترواستاتیک پوشش است، اگرچه همه باکتری‌های گرم مثبت WTA و LTA را ندارند. باکتری‌هایی که فاقد این پلیمرها هستند از نظر عملکردی فعالیت مشابهی دارند (به خصوص فعالیت الکترواستاتیکی) (۱۴). پتانسیل زتا یک اصطلاح علمی برای پتانسیل‌های الکتروکیتیک سیستم‌های کلئیدی است و از دیدگاه تئوری پتانسیل زتا، پتانسیل الکتریکی عرض یک غشای دو لایه است. در خصوص ذرات پراکنده در یک محلول هر چه میزان پتانسیل زتا بیشتر باشد نشان از پایداری بیشتر ذرات و عدم به هم چسبیدگی در بین ذرات دارد. پتانسیل زتا به طور عمده جهت تعیین کمیت مقادیر شارژ الکتریکی غشای دو لایه به کار گرفته می‌شود. هر چند علیرغم اعمال دقت فراوان در کیفیت کار انجام شده پتانسیل زتا دقیقاً مساوی با پتانسیل الکتریکی سطحی در غشای دو لایه نیست، با این وجود پتانسیل زتا تنها راه موجود برای تعیین ویژگی‌های غشاهای دو لایه است.

پتانسیل زتا نباید با پتانسیل الکترو یا پتانسیل الکتروشیمیایی اشتباه شود چرا که واکنش‌های الکتروشیمیایی اصولاً در تعیین پتانسیل زتا دخیل نیستند (۱۲). پتانسیل زتا به طور مستقیم قابل اندازه‌گیری نیست اما می‌توان با استفاده از فرمولهای تئوری و مشخص کردن تجربی میزان حرکت الکتروکیتیک یا توان حرکتی الکتروفوریتیک، دینامیک آن را محاسبه کرد. پتانسیل زتا را در یک ذره باردار با ایجاد یک میدان الکتریکی در طرفین این ذره باردار هم می‌توان اندازه‌گیری کرد. این ذره باردار با پتانسیل زتا به سمت الکتروود مثبت حرکت می‌کند و البته نسبت سرعت حرکت وابسته به مقدار و اندازه پتانسیل زتا در هر ذره است و با همین تفاوت در سرعت-ها، پتانسیل زتای ذره توسط تکنیک Laser Doppler اندازه‌گیری می‌شود و توسط فرمول‌هایی به مقادیر پتانسیل سطحی این ذرات می‌توان پی برد (۱۸-۱۵). پتانسیل الکترواستاتیک منفی در نتیجه‌ی جذب پروتون توسط یک چگالی الکترونی بالا است (۱۹). از طرف دیگر براساس قانون بارهای الکتریکی، همواره بارهای الکتریکی با ماهیت همسان همدیگر را دفع می‌کنند به طوری که ذره با بار الکتریکی منفی موجب رانش ذره دیگر با بار الکتریکی منفی می‌شود و بارهای الکتریکی با ماهیت ناهمسان همدیگر را جذب می‌کنند به نحوی که ذره با بار الکتریکی منفی، ذره دیگر با بار الکتریکی مثبت را جذب می‌کند (۲۰). با کنار هم قرار دادن دو واقعیت فوق سؤالی که پیش می‌آید این است که آیا وجود شارژ الکتریکی در سطح میکروارگانیسم‌ها می‌تواند موجب تأثیرپذیری آن‌ها از میدان‌های الکتریکی شود؟ و اینکه اگر تأثیری وجود داشته باشد به چه نحو خواهد بود؟ در راستای پاسخ به این سؤالات به خصوص جهت روشن نمودن تأثیر میدان‌های الکتریکی در جذب یا دفع باکتری‌ها، مطالعه‌ی حاضر برنامه‌ریزی و انجام گردید. هرچند زمینه‌ی مطالعاتی که بتواند دیگر اثرات میدان‌های الکتریکی بر روی ساختار سلولی باکتری، اثر داروها در حضور میدان و ... را تعیین کند وجود دارد. در این مطالعه، جذب الکتریکی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت.

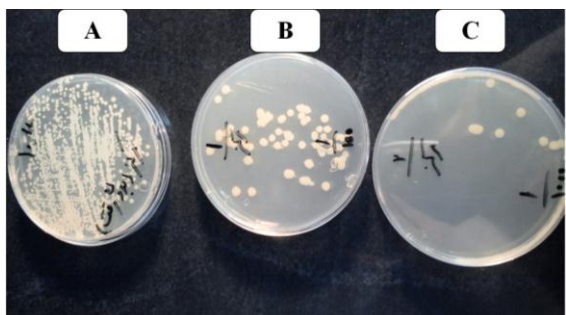
روش کار

محیط کشت مایع انتخابی برای این آزمایش نوترینت براث (Merck) بود که محیط کشت یاد شده بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تهیه و سپس در حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد و ۱/۵ پوند فشار به مدت ۱۵ دقیقه استریل و جهت ایجاد امکان جذب و دفع باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت مایع به میزان ۴۰۰ میلی‌لیتر که حدود ۵/۴ حجم ظرف آزمایشی را پر می‌کرد آماده گردید و به داخل تانک استریل شده ریخته شد. محیط کشت بلاد آگار (Merck) نیز به منظور کشت و شمارش باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا یک ظرف پلاستیکی به ابعاد ۱۲۰ mm طول، ۸۰ mm عرض و ۶۰ mm ارتفاع، جهت تعبیه‌ی میدان

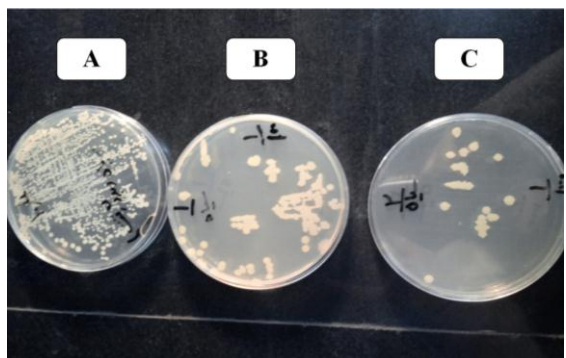
شرایط فوق در سه نوبت مجزا تا مدت ۲۴ ساعت حفظ شد تا امکان جذب باکتری‌ها توسط الکترودها فراهم آید و تعداد باکتری‌های رشد یافته از سه نوبت آزمایش انجام شده محاسبه گردید. از محل نزدیک الکتروود مثبت، قسمت وسط تانک و از محل نزدیک الکتروود منفی نمونه‌برداری انجام شد. برای محاسبه‌ی تعداد باکتری در نواحی مختلف ذکر شده ۱۰ میکرولیتر از محیط حاوی رشد باکتری برداشته شد و بعد از رقیق‌سازی در پلیت‌های مختلف کشت شده و در شرایط 37°C انکوبه گردید تا با شمارش کلنی‌های رشد یافته تعداد باکتری‌های موجود در آنها شمارش گردد (تصاویر ۲-۴). پس از انجام آزمایش، شمارش کلنی‌ها از سه ناحیه‌ی نزدیک الکتروود مثبت، وسط تانک و نزدیک الکتروود منفی در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۲: رشد باکتری *S. aureus* در نزدیکی الکتروود منفی با نمونه‌برداری در رقت‌های ۱۰ میکرولیتر (پلیت A)، ۰/۰۱ میکرولیتر (پلیت B) و ۰/۰۰۱ میکرولیتر (پلیت C).



شکل ۳: رشد باکتری *S. aureus* از وسط تانک با نمونه‌برداری در رقت‌های ۱۰ میکرولیتر (پلیت A)، ۰/۰۱ میکرولیتر (پلیت B) و ۰/۰۰۱ میکرولیتر (پلیت C).



شکل ۴: رشد باکتری *S. aureus* در نزدیکی الکتروود مثبت با نمونه‌برداری در رقت‌های ۱۰ میکرولیتر (پلیت A)، ۰/۰۱ میکرولیتر (پلیت B) و ۰/۰۰۱ میکرولیتر (پلیت C).

الکتریکی در داخل آن انتخاب شد. در دو طرف این ظرف با قرار دادن الکترودهایی فلزی به رنگ قرمز (به نشانه الکتروود مثبت) و رنگ سیاه (به نشانه الکتروود منفی) شرایط جهت ایجاد یک میدان الکتریکی در داخل ظرف فراهم آمد. تانک آماده شده در دمای 121°C درجه سانتی‌گراد و $1/5$ پوند فشار به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید و سپس مورد استفاده قرار گرفت. سوبه‌ی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213) جهت آزمایش استفاده شد به نحوی که غلظت معادل نیم مک فارلند از این باکتری در سرم فیزیولوژی آماده گردید و ۱ میلی‌لیتر از آن به ظرف حاوی محیط کشت مایع تزریق گردید. جهت پخش یکسان باکتری در محیط کشت، پس از تلقیح باکتری با لوپ استریل محیط کشت کاملاً به هم زده شد تا از پخش کامل باکتری در کل محیط اطمینان حاصل شود. دو الکتروود قرمز و مشکی به ترتیب به سیم‌های رابط پایانه مثبت و منفی ترانسفورماتور متصل شد تا تحت تأثیر میدان الکتریکی ۲ ولت قرار گرفت. نکته مهم در مورد میدان‌های الکتریکی و الکترودها این است که همواره در الکتروود منفی که الکتروود الکترون دهنده می‌باشد، تجمع الکترون وجود دارد که موجب ایجاد میدانی با بار الکتریکی منفی می‌شود که با بار الکتریکی سطحی میکروارگانیزم‌ها هم نام می‌باشد؛ از طرفی الکتروود مثبت یک الکتروود الکترون خواه بوده و همین امر موجب ایجاد میدانی در اطراف الکترودها با جهت مثبت به منفی می‌شود و هر ذره که دارای بار الکتریکی منفی باشد در اثر این میدان از الکتروود منفی دور و به الکتروود مثبت نزدیک‌تر خواهد شد.

یافته‌ها

پس از ۲۴ ساعت از شروع آزمایش که تانک در میدان الکتریکی قرار گرفت، کدورت محیط کشت در سمت الکتروود مثبت بیشتر بود، روند کاهش شفافیت محیط از الکتروود منفی (راست) به سمت الکتروود مثبت (چپ) و تجمع توده خاکستری اطراف الکتروود مثبت در تصویر ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: بیست و چهار ساعت پس از تأثیر میدان الکتریکی به تانک محتوی محیط کشت مایع محتوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تجمع باکتری‌ها در نزدیکی الکتروود مثبت (چپ).

جدول ۱: تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213) رشد یافته در نواحی سه گانه آزمایش (نزدیک الکترود مثبت، وسط تانک و نزدیک الکترود منفی).

ناحیه آزمایشی در محیط کشت	۱۰ میکرولیتر	۰/۰۱ میکرولیتر	تعداد کلنی های رشد یافته در رقت های
نزدیک الکترود مثبت	غیر قابل شمارش	۸۹*	۲۵
وسط تانک	غیر قابل شمارش	۶۲	۱۴
نزدیک الکترود منفی	غیر قابل شمارش	۳۶	۱۹

* اعداد نمایش داده شده در جدول میانگین بدست آمده از سه بار شمارش کلنی ها می باشد.

بحث

بر اساس قانون بارهای الکتریکی در فیزیک بارهای همنام همدیگر را دفع و بارهای غیرهمنام همدیگر را جذب می کنند (۲۰). بر همین مبنا برای مثال در ساختار کپسول بومن در کلیه ها یکی از عوامل مهم در پیشگیری از فیلتراسیون پروتئین ها و عدم مشاهده پروتئین در ادرار، شارژ الکتریکی منفی موجود در غشای پودوسیت ها به عنوان سلول های در برگرفته کپسول بومن است که وجود این شارژ منفی و از طرفی بار الکتریکی منفی در بسیاری از پروتئین ها، موجب جلوگیری از فیلتراسیون پروتئین ها می شود به نحوی که هرگونه اختلال در این شارژ منفی موجب اختلال در عملکرد کلیه ها و پروتئینوری می گردد (۲۱). در برخی مطالعات نشان داده شده است که کلیانس ذرات با بار الکترواستاتیک مثبت به دلیل بار الکتریکی منفی غشای پایه گلوامرولی نسبت به ذرات با بار الکترواستاتیک منفی بیشتر بوده است (۸). در برخی مطالعات اثبات شده است که با ایجاد تغییر در شارژ الکتریکی داروها تأثیرگذاری دارو تغییر می یابد (۲) که بیانگر اهمیت توجه به تأثیر بارهای الکتریکی در اثر متقابل سلول با سلول، سلول با ماده و نیز ماده با ماده در علوم زیستی است. باکتری ها و ویروس ها در pH فیزیولوژیک دارای بار الکتریکی منفی هستند (۱). این بار الکتریکی به دلیل وجود انواع فسفولیپیدهای غشایی، پپتیدوگلیکان، اسیدتیکوئیک (مشمول بر تمامی دیواره غشا یا پلیمرهای کپسولی حاوی گلیسروفسفات یا ریتول فسفات)، اسید تیکورونیک و پروتئین ها است و همانگونه که از نتایج مطالعه حاضر برمی آید میدان های الکتریکی می توانند با تأثیرگذاری بر روی این شارژ الکتریکی سطحی میکروارگانیسم ها موجب جذب و دفع آنها در جهت میدان شوند. وجود میدان الکتریکی موجب شد تا باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که مثل دیگر میکروارگانیسم ها دارای ساختار فسفولیپیدی و پروتئین و دیگر عوامل با شارژ الکتریکی منفی در سطح خود است (۱۴)، به سمت الکترود مثبت جذب شود و تعداد کلنی های رشد یافته در نمونه های برداشته شده از نواحی سه گانه بیانگر همین مسئله است. همانگونه که از شمارش تعداد کلنی ها مشخص می شود (جدول ۱)، تعداد باکتری ها از الکترود منفی به الکترود مثبت افزایش یافت که نشان از پراکندگی معنی دار و قابل تفسیر بر مبنای قانون بارهای الکتریکی می باشد، به نحوی که با نزدیک تر شدن به الکترود مثبت با تراکم بارهای مثبت تراکم باکتری ها نیز افزایش یافت. نیروی الکتریکی وارده از میدان، بر اساس قانون بارهای

همنام و ناهمنام می باشد. شدت نیرو در چنین مواقعی به عواملی هم چون شدت میدان الکتریکی، میزان شارژ الکتریکی سطحی ذره وابسته به رابطه $F = qE$ است که در این رابطه F نیروی وارد بر ذره، q میزان بار الکتریکی سطحی ذره و E شدت میدان الکتریکی است (۲۰). با توجه به رابطه یاد شده شدت میدان الکتریکی به عنوان فاکتوری مهم در میزان نیروی وارد بر ذره می باشد و می توان با افزایش یا کاهش آن در فاز های غیرمایع یا فازهای مایع با ضریب یونیزاسیون متفاوت، میزان نیروی وارد بر ذره باردار موجود در محدوده میدان را افزایش و کاهش داد. نکته مهم در بررسی نتایج توجه به فاز و ویسکوزیته محیطی است که باکتری در آن جابجا می شود؛ مسلم است که ویسکوزیته محیط کشت نیز در میزان جابجایی باکتری و نتایج حاصل از آزمایش تأثیر به سزایی دارد و هرچه میزان ویسکوزیته محیط کشت کمتر باشد امکان تأثیرگذاری میدان الکتریکی روی ذره باردار بیشتر می شود. تحقیق در زمینه تأثیرات بیولوژیک میدان های الکتریکی با توجه به ارتقای ابزار بررسی ریزسلولی می تواند امکان مناسبی برای استفاده از اطلاعات به دست آمده از این مطالعات را فراهم آورد. در مطالعه حاضر میدان الکتریکی در حالی موجب جذب و دفع و اعمال نیروی الکتریکی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می شد که در آن جابجایی باکتری به دلیل ویسکوزیته محیط کشت تحت تأثیر قرار می گرفت، به عبارتی حذف عامل ویسکوزیته محیط به عنوان عامل محدود کننده جابجایی باکتری، از قبیل طراحی آزمایش در فاز گاز، نتایج واضح تری از تأثیر میدان الکتریکی در جذب و دفع باکتری به دست می دهد که نیاز به مطالعه بیشتر در این زمینه را نشان می دهد.

نتیجه گیری

تئوری مربوط به ارائه حفاظهایی با ساختار میدان های الکتریکی برای جلوگیری از نفوذ باکتری ها و دیگر میکروارگانیسم ها با توجه به یافته های حاصل از آزمایش های انجام شده، اثبات شد و نشان داد که می توان با استفاده از همین اصل یعنی ایجاد میدان های الکتریکی منفی برای جلوگیری از نفوذ میکروارگانیسم ها به نواحی مد نظر (از قبیل دستگاه تنفسی، اتاق بیماران تحت شیمی درمانی و ...) استفاده نمود و چنین امری گام مهمی در جهت پیشگیری از مواجهه با میکروارگانیسم های خطرناک خواهد بود.

قدردانی

از مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که با حمایت مالی و از گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده پزشکی تبریز به دلیل در اختیار قرار دادن مکان تحقیق و امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مالی: مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به شماره طرح ۲۴۳۷ مورخه ۱۳۸۹/۷/۲۹.

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

مشارکت مؤلفان: م ر ن، ح ا 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.

References

- Evzen B, James H. Hurley. Structural basis for membrane targeting by the MVB12-associated β -prism domain of the human ESCRT-I MVB12 subunit. *PNAS* 2012; **109**(6): 1901-1906. doi: 10.1073/pnas.111759 7109
- Ronghua L, Ling Xi, Danfeng L, Xiangyi Ma, Wanhua Yang, Yandong Xi, et al. Enhanced targeted anticancer effects and inhibition of tumor metastasis by the TMTP1 compound peptide TMTP1-TAT-NBD. *Journal of Controlled Release* 2012; **161**: 893-902. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.002
- Haefner E W, Doenges KH, Buchholz J. Difference in cell surface 5'-nucleotidase activity, protein iodination and membrane properties between mouse lymphoma and rat adenocarcinoma cell variants with low and high-metastatic potential. *Int J Biochem* 1988; **20**(9): 929-935. doi: 10.1016/0020-711x(88)90177-2
- Carter H B, Partin A W, Coffey D S. Prediction of metastatic potential in an animal model of prostate cancer: flow cytometry quantification of cell charge. *J Urol* 1989; **142**: 1338-1341. doi: 10.1016/s0022-5347(17)39093-6
- Schaeffer B E, Schaeffer H E, Brick I. Cell electrophoresis of amphibian blastula and gastrula cells; the relationship of surface charge and morphogenetic movement. *Dev Biol* 1973; **34**: 66-76. doi: 10.1016/0012-1606(73)90339-4
- Meirelles M N, Souto-Padrón T, De Souza W. Participation of cell surface anionic sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. *J Submicrosc Cytol* 1984; **16**(3): 533-545.
- Montiero V G, Soares C P, D E Souza W. Host cell surface sialic acid residues are involved on the process of penetration of *Toxoplasma gondii* into mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **164**: 323-327. doi: 10.1016/s0378-1097(98)00229-8
- Donald E, Mager V, Chao Xu. Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Composite Nanodevices: Effect of Charge and Size on In Vivo Disposition. *Pharm Res* 2012; **29**: 2534-2542. doi: 10.1007/s11095-012-0784-7
- Zasloff A M, Adams P, Beckerman B, Campbell A, Ziying H, Luijten E. Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. *PNAS* 2011; **108**(38): 15979-15983. doi: 10.1073/pnas.1108558 108
- Burry R W, Wood J G. Contributions of lipids and proteins to the surface charge of membranes: An electron microscopy study with cationized and anionized ferritin. *J Cell Biol* 1979; **82**(3): 726-741. doi: 10.1083/jcb.82.3.726
- Snyder E L, Saenz Ch C, Denicourt C, Meade B R, Cui Xi Sh, Kaplan I M, et al. Enhanced targeting and killing of tumor cells expressing the CXCR4 chemokine receptor 4 by transducible anticancer peptides. *Cancer Res* 2005; **65**(23): 10646-10650. doi: 10.1158/0008-5472
- Seaman GVP, Uhlenbruck G. The surface structure of erythrocytes from some animal sources. *Arch Biochem Biophys* 1963; **100**: 493-502. doi: 10.1016/0003-9861(63)90117-6
- Gasic G J, Berwick L, Sorrentino M. Positive and negative colloidal iron as cell surface electron stains. *Lab Invest* 1968; **18**: 63-71.
- Jawetz A, Adelberg M. Medical Microbiology. 25th ed. New York, Mac Graw Hill, 2010; PP: 21-30.
- Löbbs M, Sonnfeld J, van Leeuwen H P, Vogelsberger W, Lyklema J. An Improved Method for Calculating Zeta-Potentials from Measurements of the Electro kinetic Sonic Amplitude. *J Colloid Interface Sci* 2000; **229**(1): 174-183. doi: 10.1006/jcis.2000.6980
- Ross S, Morrison E D. *Colloidal Systems and Interfaces*. 2nd ed. New York, John Wiley Sons, 2008; PP: 122-143.
- Qian N, Sejnowski T J. Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models. *J Mol Biol* 1988; **202**(4): 865-884. doi: 10.1016/0022-2836(88)90564-5
- Kerker M. *Electromagnetic Scattering Proceedings*. 5th ed. New York, Macmillan, 1999; PP: 122-131.
- Bozek K, Nakayama E E, Kono K, Shioda T. Electrostatic potential of human immunodeficiency virus type2 and rhesus macaque simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Frontiers in Microbiology* 2012; **3**: 206. doi: 10.3389/fmicb.2012.00206
- Tomas L. Floyd. Principles of Electric Circuits. 5th ed. New York, Thieme, 2009; PP: 502-543.
- Longo F, Kasper H, Jameson L. *Harrison's principles of Internal Medicine*. 18th ed. New York, Mac Graw Hill, 2012; PP: 2279-2286.

Knowledge of Tabriz Dentists about Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in 2015

Javad Yazdani¹ , Ali Mortazavi^{1*} , Erfan Abbasi²

¹Department of Oral Maxillofacial Surgery, University of Medical Science, Tabriz, Iran

²Dentist

*Corresponding author; E-mail: aliweb001@gmail.com

Received: 18 August 2017 Accepted: 4 November 2017 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):101-105

Abstract

Background: Bisphosphonates are commonly used in the management of skeletal complications such as metastatic bone disease, hypercalcemia of malignancy and osteoporosis. However, these chemicals may have an adverse side effect called BON (Bisphosphonate-associated osteonecrosis). The objective of this study was to assess the awareness among dentists in Tabriz, Iran about the bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ).

Methods: In this descriptive, cross-sectional study a total of 270 dentists were involved to determine their knowledge about the BRONJ. The questionnaire was already validated by ten faculty members and university researchers.

Results: The average knowledge scores of participating dentists about BRONJ was 8.47 ± 2.52 . The lowest score was 2 and the highest score was 12. There was no significant relationship between knowledge scores with age, university of graduation and the duration of clinical work experience. Women and recent graduates were found to have statistically significant more knowledge.

Conclusion: The dentists working at Tabriz city have good knowledge regarding the BRONJ.

Keyword: Knowledge, Osteonecrosis, Bisphosphonates, Osteoporosis.

How to cite this article: Yazdani J, Mortazavi A, Abbasi E. [Knowledge of Tabriz Dentists about Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw in 2015]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):101-105. Persian.

مقاله پژوهشی

میزان آگاهی دندانپزشکان عمومی شهر تبریز از نکروز استخوان فک بدنبال مصرف بیس فسفونات ها در سال ۱۳۹۴

جواد یزدانی^۱، علی مرتضوی^{۱*}، عرفان عباسی^۲

^۱بخش جراحی فک و صورت، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز، ایران
^۲دندانپزشک

* نویسنده مسوول: ایمیل: aliweb001@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۱۰۱-۱۰۵

چکیده

زمینه: بیس فسفونات ها معمولاً برای درمان عوارض اسکلتال بیماریهای متاستاتیک استخوان، هایپرکلسمی بدنبال بدخیمی و استئوپروز استفاده می شوند. از پیامدهای استفاده از این داروها، استئونکروز استخوان می باشد (Bisphosphonate-associated Osteonecrosis). هدف از این مطالعه تعیین آگاهی دندانپزشکان شهر تبریز-ایران درخصوص نکروز استخوان فک ناشی از مصرف بیس فسفونات ها (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis (BRONJ) of the Jaw بود.

روش کار: این مطالعه توصیفی-مقطعی در سال ۱۳۹۴ انجام شد. ۲۷۰ پرسشنامه جهت تعیین آگاهی دندانپزشکان در خصوص BRONJ در بین دندانپزشکان شاغل در شهر تبریز توزیع شد. روایی پرسشنامه توسط ۱۰ نفر از اعضا هیات علمی و محققین دانشگاهی مورد بررسی و تایید قرار گرفت. پس از تکمیل پرسشنامه توسط ۱۰ نفر از دندانپزشکان عمومی پایانی پرسشنامه بر اساس آزمون آلفای کرونباخ تعیین و تایید شد. داده های بدست آمده توسط روشهای آماری توصیفی (میانگین و انحراف معیار)، آزمون تی برای گروه های مستقل و آزمون همبستگی پیرسون تجزیه و تحلیل شدند. نرم افزار مورد استفاده برای این آزمونها SPSS ویرایش ۱۸ بوده و سطح معنی دار برای P value در این آزمون ها کمتر از ۰/۰۵ تلقی گردید.

یافته ها: نتایج ما نشان داد میانگین نمره دندانپزشکان شرکت کننده در خصوص BRONJ $8/47 \pm 2/52$ بود. کمترین نمره ۲ و بیشترین نمره ۱۲ بود. رابطه آماری معنی داری بین نمره آگاهی با سن وجود نداشت. خانمها بطور معنی داری آگاهی بیشتری داشتند. **نتیجه گیری:** بررسی ها نشان داد میزان آگاهی دندانپزشکان تبریز در حد مطلوبی است.

کلید واژه ها: آگاهی، استئونکروز، بیس فسفونات، استئوپروز

نحوه استناد به این مقاله: یزدانی ج، مرتضوی ع، عباسی ع. میزان آگاهی دندانپزشکان عمومی شهر تبریز از نکروز استخوان فک بدنبال مصرف بیس فسفونات ها در سال ۱۳۹۴. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳): ۱۰۱-۱۰۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتو 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

علی رغم افزایش شناخت از مکانیسم بیس فسفونات ها و شرایط استفاده از آنها باز هم گزارش های مربوط به BRONJ در حال افزایش هستند. پس باید به بیمارانی که از بیس فسفونات ها استفاده می کنند توجه خاصی نشان داد و حتی الامکان از کشیدن دندان و جراحی های دنتوآلوئولار اجتناب ورزید. هدف از این پژوهش، میزان آگاهی دندانپزشکان شهر تبریز از BRONJ می باشد.

روش کار

جمعیت هدف این مطالعه دندانپزشکان شاغل در شهر تبریز در سال ۱۳۹۴ بودند و حجم نمونه با استفاده از فرمول ۲۷۰ نفر محاسبه شد. معیارهای ورود به این مطالعه عضویت در سازمان نظام پزشکی، دارا بودن پروانه دائم پزشکی یا مجوز کار و معیارهای خروج از مطالعه تحصیل در مقاطع بالاتر دوره عمومی بود. ابزار گردآوری داده ها پرسشنامه ای محقق ساخته بر اساس کتاب پترسون بود. در مجموع ۲۷۰ پرسشنامه در بین شرکت کنندگان توزیع شد و همه آن ها جمع آوری گردید. روائی پرسشنامه توسط ۱۰ نفر از اعضای هیات علمی مورد بررسی تصحیح و تایید قرار گرفت. پس از تکمیل پرسشنامه توسط ۱۰ نفر از دندانپزشکان عمومی پایانی پرسشنامه بر اساس آزمون آلفای کرونباخ تعیین و تایید شد. این پرسشنامه در دو بخش کلی بخش اول شامل اطلاعات و مشخصات فردی مانند جنس سن مدت اشتغال به کار کلینیکی و بخش دوم شامل سوالات پژوهشی در جهت دستیابی به اهداف مطالعه جمعه در قالب ۱۲ سوال مطرح شد. به هر سوال بر اساس درست یا غلط بودن جواب نمره ۱ یا صفر تعلق گرفت. در این مطالعه آگاهی دندانپزشکان عمومی شاغل در شهر تبریز براساس حداقل و حداکثر امتیاز بین (۰ تا ۱۲) محاسبه و بدین صورت امتیاز کلی برای هر فرد محاسبه شد. آنالیز آماری: داده های بدست آمده توسط روشهای آماری توصیفی (میانگین و انحراف معیار)، آزمون تی برای گروه های مستقل و آزمون همبستگی پیرسون تجزیه و تحلیل شدند. نرم افزار مورد استفاده برای این آزمونها SPSS ویرایش ۱۸ بوده و سطح معنی دار برای P value در این آزمون ها کمتر از ۰/۰۵ تلقی گردید.

یافته ها

از بین ۲۷۰ نفر شرکت کننده در این تحقیق ۱۸ نفر ۶۹/۶٪ مرد و ۸۲ نفر ۳۰/۴٪ زن بودند و میانگین سنی آنها 32.7 ± 13.4 سال بود. ۵۷/۸٪ فارغ التحصیل دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۸/۱٪ فارغ التحصیل علوم پزشکی تهران، ۵/۹٪ فارغ التحصیل دانشگاه علوم پزشکی رشت و بقیه فارغ التحصیل سایر دانشگاههای علوم پزشکی کشور بودند. میانگین مدت زمان فراغت از تحصیل آنها 6.1 ± 5.6 سال بود. میانگین مدت زمان اشتغال به کار بالینی آنها

بیس فسفونات ها آنالوگ های سنتتیک پایدار غیر ارگانیک پیروفسفات ها هستند که عمل بازجذب استخوانی استئوکلاست ها را با بلوک کردن HMG-COA(3-hydroxy-Methylglutaryl-CoA) (Coenzyme A) که آنزیم مسوول Osteoclast enzyme prenylation است انجام می دهد (۱-۲). همچنین این دسته دارویی و ترکیبات آنها علاوه بر خاصیت جلوگیری از تحلیل و تخریب استخوانی دارای خواص ضد آنژیوژنز و تومورال هستند که مورد دوم باعث افزایش طول عمر بیماران مبتلا به بدخیمی می شود (۲-۳). بدین خاطر از این دسته داروها در درمان بیماران متابولیکی کلسیم مثل استئوپروز، بیماری پازه، بدخیمی هائی که هایپرکلسمی ایجاد می کنند و همچنین ضایعات خوش خیم یا بدخیم همراه با تخریب استخوان مثل ضایعات متاستاتیک فکین در مالتیپل میلوما، سرطان پستان و پروستات استفاده می کنند. این داروها برای جلوگیری از تحلیل استخوان در افرادی که دچار بیماری آرتریت روماتوئید هستند استفاده می شوند. این دسته دارویی در بیماران خردسال نیز در کنترل علائم استئوژنز ایمپرکتا و Idiopathic juvenile osteopetrosis استفاده می شوند (۴، ۵، ۱). آلودرونها و رزیدرونها از جمله شایعترین بیس فسفونات ها هستند که در درمان استئوپروز و پازه مورد استفاده قرار می گیرند. این دسته دارویی نیز مانند تمامی داروهای دیگر علاوه بر خواص درمانی دارای عوارض جانبی هم هستند که ارتباط مستقیم با نحوه و مدت زمان استفاده از آنها دارد (۵). در کنار خواص فوق العاده بیس فسفونات ها و افزودن بر کیفیت زندگی کسانی که دچار متاستازهای استخوانی هستند یا از استئوپروز رنج می برند یکی از بدترین پیامدهای استفاده از آنها ایجاد

Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ) Bisphosphonate-Related یا نکروز استخوان فک مربوط به استفاده از بیس فسفونات ها است. انجمن جراحان فک و صورت آمریکا در سال ۲۰۰۷ BRONJ را بعنوان استخوان نمایان شده در ناحیه فک و صورت حداقل به مدت ۸ هفته در بیماری که از بیس فسفونات ها استفاده کرده و سابقه پرتودرمانی را ذکر نمی کند تعریف کرد (۵). اگرچه مکانیسم های مختلفی برای توجیه چگونگی ایجاد BRONJ ذکر شده ولی هیچکدام به تنهایی نمی توانند توضیح قطعی تمام تغییرات مورفولوژیک حاصله چه به صورت میکروسکوپی و چه به صورت ماکروسکوپی را توجیه کنند و پاتوژنز آن بطور قطع مشخص نیست ولی قویترین فرضیه تغییرات فیزیولوژیک در ریمادلینگ استخوان است (۶-۷). بزرگترین ریسک فاکتور BRONJ استفاده طولانی مدت از بیس فسفونات ها به همراه جراحی دنتوآلوئولار به خصوص کشیدن دندان ها است (۲). میزان شیوع آن در بین کسانی که از بیس فسفونات ها بصورت داخل وریدی استفاده می کنند در حدود ۸-۱۲٪ تخمین زده می شود.

۵/۴±۵/۴ سال بود. ۸۰٪ شرکت کنندگان تا کنون در هیچ دوره بازآموزی مربوط به عوارض جانبی داروها شرکت نکرده بودند. ۱۱/۱ در ۱ دوره ۳/۳٪ در دو دوره ۵/۶٪ در بیش از ۲ دوره بازآموزی شرکت کرده بودند. میانگین نمره شرکت کنندگان تحقیق ۸/۴۷±۲/۵۲ (کمترین نمره ۲ و بیشترین نمره ۱۲) بود. در ادامه به بررسی ارتباط بین نمره آگاهی و متغیرهای جنسیت سن دانشگاه محل تحصیل مدت زمان گذشته از فارغ التحصیلی مدت زمان اشتغال به کار کلینیکی و تعداد بازآموزی های شرکت شده مربوط می پردازیم. میانگین نمره شرکت کنندگان در تحقیق بر حسب جنسیت در جدول ۱-۱ آورده شده است.

جدول ۱-۱: میانگین نمره شرکت کنندگان در تحقیق بر حسب جنسیت

جنسیت	میانگین ± انحراف معیار
زن	۹/۹۳±۱/۴۹
مرد	۷/۸۳±۲/۶۲
کل	۸/۴۷±۲/۵۲

آزمون independent sample t-test نشان داد بین میانگین نمره آگاهی زنان و مردان تفاوت معنی دار آماری دیده شد و میانگین نمره آگاهی زنان بیشتر از میانگین مردان بود.

$$T=-۸/۳۲ \quad df=۲۴۹/۸۵۱ \quad Pvalue<۰/۰۰۱$$

جهت بررسی وجود ارتباط آماری معنی دار بین سن شرکت کنندگان در مطالعه و نمره آگاهی ایشان از آزمون پیرسون استفاده شد. نتایج آزمون پیرسون نشان داد بین سن شرکت کنندگان و نمره آگاهی ایشان رابطه معنی دار آماری وجود ندارد.

$$P \text{ value: } ۰/۸۲۳ \quad \text{pearson correlation: } ۰/۰۱۴$$

بحث

در این مطالعه آگاهی دندانپزشکان عمومی شهر تبریز در خصوص استئونکروز فک ناشی از مصرف بیس فسفونات ها (BRONJ) مورد بررسی قرار گرفته است. بیس فسفونات ها تحلیل استخوان را مهار کرده و در درمان مالتیپل میلوما، متاستاز استخوانی، و هایپرکلسمی بدخیم مورد استفاده قرار می گیرند که در این بیماران افزایش طول عمر و بهبود کیفیت زندگی را در پی داشته اند (۸-۹). همچنین این داروها بطور گسترده در پیشگیری و درمان استئوپروزیس و بیماریهای استخوان نظیر پاورت مورد استفاده قرار می گیرند (۸-۱۰). در این مطالعه برای بررسی آگاهی در مورد استئونکروز ناشی از مصرف بیس فسفونات ۱۲ سوال از ۲۷۰ دندانپزشک شرکت کننده در مطالعه پرسیده شد که میانگین نمرات آنها ۸/۷۴±۲/۲۵ بدست آمد که کمترین نمره آنها ۲ و بیشترین ۱۲ بود. در مطالعه لویز و همکاران (۱۱) ۶۸/۳٪ دانپزشکان دارای آگاهی و اطلاعات بروز بودند در حالیکه در مطالعه Al-Mohaya و همکاران این آگاهی در کمترین سوم شرکت کنندگان ۳۱/۵٪ مشاهده شد. نتایج مطالعه نشان داد میانگین نمره آگاهی زنان بطور معنی داری بیشتر از مردان است که در توافق با نتیجه مطالعه

Al-Hussain (۱۲) می باشد. بین سن شرکت کنندگان در مطالعه و میزان آگاهی شان از استئونکروز وابسته به بیس فسفونات ارتباط معنی داری مشاهده نشد که این امر در تضاد با نتایج مطالعه Al-hussain (۱۲) می باشد که نشان داد در گروه سنی کمتر از ۳۴ سال آگاهی در مورد BRONJ بیشتر از سایر گروههای سنی است. نبود ارتباط معنی دار بین آگاهی و سن شرکت کنندگان در مطالعه ما می تواند ناشی از پاسخ غیر دقیق و یا نادرست شرکت کنندگان در مورد سن آنها باشد. اگرچه اکثریت دندانپزشکان شرکت کننده در مطالعه ۵۷/۸٪ فارغ التحصیل دانشگاه علوم پزشکی تبریز بودند ولی تفاوت معنی داری بین میانگین نمره آگاهی فارغ التحصیلان دانشگاههای مختلف مشاهده نشد. نتایج این مطالعه وجود ارتباط معنی دار بین مدت زمان گذشته از فارغ التحصیلی شرکت کنندگان و میزان آگاهی آنها از استئونکروز وابسته به بیس فسفونات را نشان داد که با افزایش فاصله زمانی از تاریخ فارغ التحصیلی نمره آگاهی شان کاهش می یابد که در هماهنگی با نتایج مطالعه Al-hussain (۱۲) می باشد. آگاهی بیشتر فارغ التحصیلان اخیر می تواند به آموزش به روزتر کسب شده در طی تحصیل در دانشکده دندانپزشکی نسبت داده شود. بین مدت زمان اشتغال به کار بالینی و آگاهی از استئونکروز ناشی از بیس فسفونات ارتباط معنی داری یافت نشد. این در حالی است که در مطالعه Al-Mohaya و همکاران ارتباط معنی دار بین تعداد سال تجربه کار بالینی و میزان آگاهی دیده شد و نشان دادند که با افزایش تجربه کار بالینی میزان آگاهی نیز افزایش می یابد. نبود ارتباط معنی دار بین آگاهی دندانپزشکان و تعداد سال اشتغال به کار بالینی می تواند ناشی از کمبود موارد BRONJ یا عدم مراجعه این بیماران به دندانپزشک و همچنین تعداد بسیار کم بازآموزی های دوره ای باشد. ارتباط بین آگاهی از استئونکروز ناشی از بیس فسفونات و تعداد بازآموزی های مربوط به عوارض جانبی دارو گذرانده شده توسط دندانپزشکان شرکت کننده در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که تفاوت معنی داری بین میانگین نمره آگاهی بر اساس تعداد بازآموزی گذرانده شده وجود دارد و افرادی که بیشتر از دو بازآموزی را گذرانده اند نسبت به افرادی که تنها دو بازآموزی گذرانده اند بطور معنی داری آگاهی بیشتری داشتند. در توافق با این نتیجه گیری Al-hussain در مطالعه خود نشان داد که تفاوت قابل توجه در آگاهی میان دندانپزشکان عمومی و متخصصان ناشی از شرکت در سمینارها و بازآموزی ها یا تجربه بالاتر در مواجهه با بیماران BRONJ می باشد. در مطالعات مختلف نبود دوره های بازآموزی مرتب کار بیش از حد در مطب و عدم مطالعه فقدان تبادل اطلاعات بین محیط های آکادمیک و دندانپزشکان بعنوان موانعی که بر سر راه دندانپزشک برای کسب آگاهی و مهارت کافی در زمینه های علمی و عملی مختلف وجود دارد مطرح شده است (۱۴-۱۳).

نتیجه گیری

از داده های بدست آمده از این مطالعه می توان نتیجه گرفت میزان آگاهی دندانپزشکان عمومی شهر تبریز در خصوص BRONJ در حد مطلوب می باشد. بیمار مبتلا به استئونکروز ناشی از بیس فسفونات می تواند چالش بزرگی برای دندانپزشک باشد و لزوم آگاهی از علائم درمانها و مدیریت این بیماران برای هر دندانپزشکی لازم می باشد.

این مقاله منتج از پایانامه تحقیقاتی به شماره ۱۴۴۸ دانشکده دندانپزشکی می باشد.

این مقاله شامل ملاحظات اخلاقی نمی شود.

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

در نگارش این مقاله از منابع مالی هیچ ارگان یا موسسه ای استفاده نشده است.

References

1. Cone-Neto N, Bastos A S. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis patients affected by oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Head and Face Medicine* 2012; **8**: 9-5. doi: 10.1186/1746-160X-8-5
2. Margaix-Munoz M, Bagan J, Poveda-Roda R. Intravenous oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: influence of coadjuvant antineoplastic treatment and study of buccodental condition. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; **18**(2): 194-200. doi: 10.4317/medoral.18604
3. Torres S R, Chen C S K, Leroux B G, Lee P P, Hollender L g. Short communication Fractal dimension evaluation of cone beam computed tomography in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis. *Dentomaxfac Radio* 2011; **40**: 501-508. doi: 10.1259/dmfr/14636637
4. Sharma D, Sasolvanovski A, Selvin M, Hamlet S, Pop S T, KlaraBrinzaniuc B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ): diagnostic criteria and possible pathogenic mechanism of an unexpected antiangiogenic side effect. *Vas Cell* 2013; **5**: 1-5. doi: 10.1186/2045-824X-5-1
5. Ruggiero S L, Mehrotra, Rosenberg T J, Engroff S L. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; **62**: 527-534. doi: 10.1016/j.joms.2004.02.004
6. Marunick M, Miller R, Gordon S. Adverse oral sequelaeto bisphosphonate administration. *J Mich Dent Assoc* 2005; **87**: 44-49.
7. Lam D K, Sandor G K B, Holmes H I, Wayne Evans A. A review of Bisphosphonate-Associated osteonecrosis of the jaws and it's management. *Journal of the Canadian dental association* 2007; **73**(5): 417-422.
8. Advisory Task Force on Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, American Association of oral and Maxillofacial Surgeons. Position paper on Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* 2007; **65**: 369-376. doi:10.1016/j.joms.2006.11.003
9. Pazianas M, Miller P, Blumentals W A, Bernal M, Kothawala M. A review of the literature osteonecrosis of the jaws in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors and clinical characteristics. *Clinical Therapeutics* 2007; **29**(8): 1548-1558. doi:10.1016/j.clinthera.2007.08.008
10. Hoff A O, Toth B B, Altundag K. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis og the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *Journal Bone Mineral Research* 2008; **23**(6): 826-836. doi: 10.1359/jbmr.080205
11. Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Minano F, Gomez-Garcia F. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. Knowledge and attitudes of dentists and dental students: a preliminary study. *Jeval Clin Pract* 2010; **16**(5): 878-882. doi: 10.1111/j.1365-2753.2009.01203.x
12. Alhussain A. (knowledge, practice and opinions of Ontario dentists when treating patients receiving bisphosphonates. A thesis submitted in conformity with the requirements for the degree of Master of Science graduate oral and maxillofacial surgery, university of Toronto. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2015; **73**(6): 1095-1105. doi: 10.1016/j.joms.2014.12.040
13. Cabana M D, Rand C S, Powe N R, Wu A W, Wilson M H, Abboud PA, et al. Why don't physicians follow clinical practice quidelines? A framework for improvement. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 1999; **282**(15): 1458-1465. doi: 10.1203/00006450-199904020-00719
14. Van der Sanden W J, Mettes D G, Plasschaert A J, Van't Hof M A, Grol R P, Verdonchort E H. Clinical practice quidilines in dentistry: opinion of dental practitioners on their contribution to the quality of dental care. *Quality & Safety in health care* 2003; **12**(2): 107-111.